



SKRIPSI – TK141581

**PENGARUH JENIS PELARUT DAN TEMPERATUR
TERHADAP *TOTAL PHENOLIC CONTENT*, *TOTAL
FLAVONOID CONTENT*, DAN AKTIVITAS
ANTIOKSIDAN DI EKSTRAK DAUN NYAMPLUNG
(*Calophyllum inohyllum*)**

Oleh :

Imelia Yohed

NRP. 2313 100 129

Rachel Angie Kristianita

NRP. 2313 100 155

Dosen Pembimbing :

Setiyo Gunawan, ST., Ph.D

NIP. 19760323 200212 1 001

**DEPARTEMEN TEKNIK KIMIA
FAKULTAS TEKNOLOGI INDUSTRI
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2017**



FINAL PROJECT – TK141581

**EFFECT OF TYPE OF SOLVENT AND TEMPERATURE
IN TOTAL PHENOLIC CONTENT, TOTAL FLAVONOID
CONTENT, AND ANTIOXIDANT ACTIVITY ANALYSIS
IN NYAMPLUNG LEAVES EXTRACT (*Calophyllum
inophyllum*)**

By :

Imelia Yohed

NRP. 2313 100 129

Rachel Angie Kristianita

NRP. 2313 100 155

Academic Advisor :

Setiyo Gunawan, ST., Ph.D

NIP. 19760323 200212 1 001

**DEPARTMENT OF CHEMICAL ENGINEERING
FACULTY OF INDUSTRIAL TECHNOLOGY
SEPULUH NOPEMBER INSTITUTE OF TECHNOLOGY
SURABAYA
2017**

LEMBAR PENGESAHAN

**“PENGARUH JENIS PELARUT DAN TEMPERATUR
TERHADAP TOTAL PHENOLIC CONTENT, TOTAL
FLAVONOID CONTENT, DAN AKTIVITAS
ANTIOKSIDAN DI EKSTRAK DAUN NYAMPLUNG
(*Calophyllum inophyllum*)”**

Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh
gelar Sarjana Teknik pada Program Studi S-1 Departemen
Teknik Kimia Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Surabaya

Oleh :

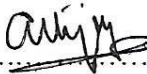
Imelia Yohed 2313 100 129
Rachel Angie K. 2313 100 155

Disetujui oleh Tim Penguji Tugas Akhir:

1. Setiyo Gunawan, ST., Ph.D
(Pembimbing 1)

(.....)

3. Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng
(Penguji I)

(.....)

4. Prof. Dr. Ir. Tri Widjaja, M.Eng
(Penguji II)

(.....)



**PENGARUH JENIS PELARUT DAN TEMPERATUR
TERHADAP ANALISA *TOTAL PHENOLIC
CONTENT, TOTAL FENOLIC CONTENT*, DAN
AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DI EKSTRAK DAUN
NYAMPLUNG (*Calophyllum inophyllum*)**

Nama : 1. Imelia Yohed (2313 100 129)
2. Rachel Angie K (2313 100 155)
Pembimbing : Setiyo Gunawan, S.T., Ph.D
Departemen : Teknik Kimia FTI-ITS

ABSTRAK

Nyamplung (*Calophyllum inophyllum*) merupakan salah satu tanaman yang digunakan sebagai bahan baku obat. Hampir setiap bagian tanaman nyamplung bermanfaat dalam menyembuhkan luka, peradangan, dan pengobatan penyakit. Saat ini, banyak penelitian mengenai tanaman nyamplung. Tujuannya adalah untuk mengetahui senyawa bioaktif yang terkandung di tanaman nyamplung, termasuk daunnya. Secara tradisional, daun nyamplung digunakan dalam mengobati iritasi pada mata dan mengobati luka. Penelitian mengenai daun nyamplung berfokus pada analisa kandungan fitokimia, karakteristik obat, dan kandungan senyawa bioaktif. Metode yang umum digunakan dalam analisa tersebut adalah ekstraksi dengan pelarut (*solvent extraction*). Berdasarkan penelitian yang sudah ada, daun nyamplung mengandung senyawa fitokimia, seperti tannin, terpenoid, alkaloid, flavonoid, dan sebagainya. Ekstrak daun nyamplung juga berpotensi sebagai zat anti-kanker payudara, anti-iritasi (*anti-inflammatory*), dan zat obat lainnya. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisa pengaruh jenis pelarut, konsentrasi pelarut, dan temperatur terhadap *yield* ekstrak, *Total Phenolic Content* (TPC), *Total Flavonoid Content* (TFC), dan aktivitas antioksidan di ekstrak daun nyamplung. Daun nyamplung diekstraksi dengan N-Heksana terlebih dahulu untuk

menghilangkan senyawa non-polar (*non-polar removal*), untuk selanjutnya diekstraksi untuk mendapatkan *crude extract* daun nyamplung. Dalam ekstraksi daun nyamplung, terdapat tiga jenis pelarut dan konsentrasi yang digunakan: methanol (konsentrasi 50, 80, dan 100%), etanol (50, 80, dan 100%), dan aseton (50, 80, dan 100%). Tiga temperatur digunakan dalam ekstraksi: 30, 45, dan 60°C. *Crude extract* daun nyamplung kemudian dianalisa TPC, TFC, dan aktivitas antioksidannya sesuai dengan metode. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa konsentrasi pelarut berpengaruh signifikan terhadap *yield* ekstrak, hasil TPC, dan hasil TFC ($P\text{-value}<0,05$), sedangkan jenis pelarut tidak mempengaruhi ketiganya secara signifikan ($P\text{-value}>0,05$). Temperatur ekstraksi secara signifikan hanya mempengaruhi hasil TPC ($P\text{-value}<0,05$). Hasil analisa *free radical scavenging* dengan DPPH menunjukkan bahwa daun nyamplung memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi, karena tingginya kandungan fenolik dan flavonoid. Kondisi optimum yang menghasilkan %*yield* tertinggi adalah aseton 50% suhu 60°C (18,67%). Kondisi optimum yang menghasilkan TPC tertinggi adalah metanol 50% 45°C (292,044 mg GAE/gram ekstrak). Kondisi optimum yang menghasilkan TFC tertinggi adalah metanol 50% 30°C (1289 mg QE/gram ekstrak).

Kata Kunci: Daun nyamplung, Total Phenolic Content (TPC), Total Flavonoid Content (TFC), DPPH, Metanol, Etanol, Aseton, Temperatur, Senyawa Bioaktif.

**EFFECT OF TYPE OF SOLVENT AND
TEMPERATURE IN TOTAL PHENOLIC CONTENT,
TOTAL FLAVONOID CONTENT, AND
ANTIOXIDANT ACTIVITY ANALYSIS IN
NYAMPLUNG LEAVES EXTRACT (*Calophyllum
inophyllum*)**

Name : 1. Imelia Yohed (2313 100 129)
2. Rachel Angie K (2313 100 155)
Advisor : Setiyo Gunawan, S.T., Ph.D
Departement : Chemical Engineering FTI-ITS

ABSTRACT

Nyamplung (*Calophyllum inophyllum*) is one of the plant that is used as medicines. Almost every part of nyamplung is useful to treat wounds, inflammation, and cure diseases. Nowadays, there are many experiments about nyamplung. The objective of those experiments is identifying the bioactive compound contained in nyamplung. One part of nyamplung, that is in developing, is the leaves. Traditionally, nyamplung leaves are used to treat inflammation in eyes and treat wounds. The research about nyamplung leaves is focused on the analysis of the phytochemical content, the characteristic of medicine, and the bioactive compound content. The common method used in analyzing those contents are solvent extraction method. Based on the recent studies, nyamplung leaves contain phytochemical content, such as tannin, terpenoid, alkaloid, flavonoid, etc. The extract of nyamplung leaves are potential to be the cure of breast cancer (anticancer drugs), anti-inflammatory drugs, and other medicines. The objectives of this experiment were to analyze to effect of types of solvent, concentration of solvent, and temperature in relation to extract yield, Total Phenolic Content (TPC), Total Flavonoid Content (TFC), and antioxidant activities in nyamplung leaves extract. First, the leaves of nyamplung were

extracted using N-Hexane to remove the non-polar fraction contained in nyamplung leaves. Then, they were extracted again to obtain the crude extract. In the extraction of nyamplung leaves, three types of solvent and concentration were used: methanol (50, 80 and 100%), ethanol (50, 80, and 100%), and acetone (50, 80 and 100%). Three temperatures were used in the extraction: 30, 45, and 60°C. The crude extracts were analyzed to determine the value of TPC, TFC, and the antioxidant activity, according to the method. The result of the experiment shows that concentration of solvent was significantly affecting the yield of the extract, TPC, and TFC (P-value<0,05), while types of solvent was not significantly affecting the three parameters (P-value>0,05). Moreover, temperature of extraction was significantly affecting the TPC value (P-value<0,05). The analysis of free radical scavenging with DPPH showed that nyamplung leaves had a high antioxidant activity due to the high content of phenolic and flavonoid compound. The optimum condition that gives the highest %yield is acetone 50% at temperature 60°C (18,67%). The optimum condition that gives the highest value of TPC is methanol 50% at temperature 45°C (292,044 mg GAE/gram extract). The optimum condition that gives the highest value of TFC is methanol 50% at temperature 30°C (1289 mg QE/gram extract).

Keyword: *Nyamplung's Leaves, Total Phenolic Content (TPC), Total Flavonoid Content (TFC), Methanol, Ethanol, Acetone, Temperature, Bioactive Compound.*

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis ucapkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas kasih, penyertaan, dan anugerah-Nya yang berlimpah sehingga penulis dapat menyelesaikan proposal skripsi ini dengan judul:

**“PENGARUH JENIS PELARUT DAN TEMPERATUR
TERHADAP ANALISA *TOTAL PHENOLIC CONTENT*,
TOTAL FLAVONOID CONTENT, DAN AKTIVITAS
ANTIOKSIDAN DI EKSTRAK DAUN NYAMPLUNG
(*Calophyllum inophyllum*)”**

sebagai syarat kelulusan bagi mahasiswa tahap sarjana di Departemen Teknik Kimia, Fakultas Teknologi Industri, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya. Pada kesempatan ini, penulis mengucapkan terima kasih atas segala bantuan dalam menyelesaikan skripsi ini kepada:

1. Bapak Setiyo Gunawan, S.T., Ph.D, selaku Dosen Pembimbing, atas bimbingan, saran, dan motivasi serta dukungan semangat untuk mengerjakan dengan sebaik mungkin, karena tidak ada yang sia-sia atas apa yang sudah dilakukan.
2. Bapak Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng selaku Kepala Laboratorium Teknologi Biokimia Departemen Teknik Kimia FTI-ITS, atas bimbingan, saran, dan motivasi yang diberikan.
3. Kedua orang tua dan saudara kandung penulis atas doa, kasih sayang dan dukungan semangat yang terus tercurah.
4. Rekan-rekan seperjuangan, Ilham, Wuwuh, Abdul, Lita, Mba Tika, dan Mba Sekar yang sudah sama-sama berjuang serta Mas David yang juga turut serta memberikan saran dan motivasi.

Penulis menyadari bahwa laporan skripsi ini tidak luput dari berbagai kekurangan, oleh karena itu penulis mengharapkan

saran dan kritik yang membangun. Semoga laporan skripsi ini kelak dapat bermanfaat bagi semua pihak.

Surabaya, 24 Juli 2017

Penulis

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	
ABSTRAK	i
ABSTRACT	iii
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	x
BAB I PENDAHULUAN	
I.1 Judul.....	I-1
I.2 Latar Belakang.....	I-1
I.3 Rumusan Masalah.....	I-4
I.4 Batasan Masalah	I-4
I.5 Tujuan Penelitian	I-4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
II.1 Kondisi Tanaman Nyamplung (<i>Calophyllum inophyllum</i>) di Indonesia.....	II-1
II.2 Persebaran Tanaman Nyamplung (<i>Calophyllum inophyllum</i>) di Indonesia.....	II-1
II.3 Morfologi Tanaman Nyamplung (<i>Calophyllum inophyllum</i>)	II-2
II.4 Manfaat Tanaman Nyamplung.....	II-4
II.5 Ekstraksi dengan Pelarut.....	II-4
II.5.1 Jenis Pelarut	II-4
II.5.2 Sistem Pelarut	II-5
II.5.3 Kondisi Temperatur.....	II-5
II.5.4 Macam Ekstraksi	II-6
II.6 Interaksi Antar Molekul.....	II-7
II.7 Senyawa Fenolik	II-8
II.8 Total Kandungan Fenolik	II-9
II.9 Total Kandungan Flavonoid.....	II-9
II.10 Aktivitas Antioksidan	II-10
II.11 Spektrofotometri.....	II-12
II.12 Penelitian Terdahulu	II-13

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

III.1 Proses Ekstraksi dan Analisa Kandungan Senyawa Bioaktif	III-1
III.2 Bahan dan Peralatan	III-1
III.3 Metode Penelitian.....	III-2
III.3.1 Bahan Penelitian	III-2
III.3.2 Prosedur Penelitian	III-2
III.3.2.1 <i>Non-polar Removal</i> Daun Nyamplung	III-2
III.3.2.2 Ekstraksi Daun Nyamplung dengan Ekstraksi Solid-Liquid	III-3
III.3.2.3 Analisa Total Kandungan Fenolik, Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan.....	III-4

BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

IV.1 Ekstraksi Daun Nyamplung dengan Ekstraksi Solid-Liquid.....	IV-1
IV.2 Pengaruh Jenis Pelarut dan Temperatur terhadap <i>Yield</i> Ekstrak Daun Nyamplung	IV-4
IV.3 Pengaruh Jenis Pelarut dan Temperatur terhadap TPC di Ekstrak Daun Nyamplung	IV-7
IV.4 Pengaruh Jenis Pelarut dan Temperatur terhadap TFC di Ekstrak Daun Nyamplung	IV-10
IV.5 Pengaruh Jenis Pelarut dan Temperatur terhadap Aktivitas Antioksidan di Ekstrak Daun Nyamplung.	IV-14
IV.6 Hubungan antara TPC, TFC, dan Aktivitas Antioksidan.....	IV-15

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

V.1 Kesimpulan	V-1
V.2 Saran.....	V-1

DAFTAR PUSTAKA	xi
-----------------------------	----

APPENDIKS

RIWAYAT PENULIS

DAFTAR GAMBAR

Gambar II.1 Persebaran Tanaman Nyamplung di Indonesia.....	II-2
Gambar II.2 Tanaman Nyamplung (<i>Callophyllum inophyllum</i>).....	II-3
Gambar II.3 Struktur Kimia Senyawa Flavones	II-8
Gambar II.4 Struktur Dasar Senyawa Non-Flavonoid	II-9
Gambar II.5 Reaksi Kompleks Flavonoid dengan $AlCl_3$..	II-10
Gambar II.6 Struktur Kimia DPPH Radikal (<i>1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl</i>)	II-11
Gambar II.7 Kemungkinan reaksi yang terjadi antara Quercetin dengan DPPH.....	II-12
Gambar III.1 Skema <i>Non-Polar Removal</i>	III-3
Gambar III.2 Skema Ekstraksi Daun Nyamplung	III-4
Gambar III.3 Skema Analisa Total Kandungan Fenolik dengan Metode Folin-Ciocalteu	III-6
Gambar III.4 Skema Analisa Total Kandungan Flavonoid dengan Metode Kolorimetrik Alumunium Klorida .	III-8
Gambar III.5 Skema Analisa Aktivitas Antioksidan.....	III-9
Gambar IV.1.1 (a) Maserasi untuk Ekstraksi Daun Nyamplung (b) <i>Crude Extract</i> Daun Nyamplung.....	IV-3
Gambar IV.2.1 Grafik <i>Yield Crude Extract</i> Daun Nyamplung	IV-5
Gambar IV.3.1 Grafik Hasil Analisa TPC Daun Nyamplung	IV-8
Gambar IV.4.1 Grafik Hasil Analisa TFC Daun Nyamplung	IV-12

DAFTAR TABEL

Tabel IV.1.1 Indeks Polaritas Pelarut	II-2
---	------

DAFTAR PUSTAKA

- Arkeman, Yandra., Setyaningsih, Dwi., Sanday, Tika Ari. 2012. *Analisis Tekno-Ekonomi Pendirian Pabrik Biodiesel dari Biji Nyamplung (Calopyllum inophyllum L.)*, Jurnal Teknologi Industri Pertanian 22 (3), pp. 198-208.
- Aparamarta, Hakun Wirawasista., Qadariyah, Lailatul., Gunawan, Setiyo., Ju, Yi-Hsu. 2016. *Identification of Triacylglycerol in Non Polar Lipid Fraction Isolated from Nyamplung Oil (Calophyllum inophyllum Oil)*. Department of Chemical Engineering, National Taiwan University of Science and Technology, Taipei, Taiwan.
- Bag, G.C., Devi, P. Grihanjali., Bhaigyabati, Th. 2015. *Assesment of Total Flavonoid Content and Antioxidant Activity of Methanolic Rhizome Extract of Three Hedychium Species of Manipur Valley*. Departement of Chemistry, Imphal College, Manipur, India.
- Bartosz dan Tirzitis. 2010. *Determination of Antiradical and Antioxidant Activity: Basic Principle and New Insights*, Polandia.
- Bhaigyabati, dkk. 2014. *Assessment of Total Flavonoid Content and Antioxidant Activity of Methanolic Rhizome Extract of Three Hedychium Species of Manipur Valley*, Manipur, India.
- Cicco, dkk. 2009. *A Reproducible, Rapid and Inexpensive Folin-Ciocalteu Micro-Method in Determining Phenolics of Plant Methanol Extracts*, Foggia, Italy.
- Dailey, Adriana. Vuong, Quan V. 2015. *Effect of Extraction Solvents on Recovery of Bioactive Compounds and Antioxidant Properties from Macadamia (Macadamia tetraphylla) Skin Waste*. Nutrition & Health Research Group, University of Newcastle, New South Wales, Australia.
- Dent, Maja., Dragovic-Uzelac, Verica., Penic, Marija., Brncic, Mladen., Bosiljkov, Tomislav., Levaj, Branka. 2013. *The*

Effect of Extraction Solvents, Temperature, and Time of Composition and Mass Fraction of Polyphenols in Dalmatian Wild Sage (salvia officinalis L.) Extracts. Faculty of Food Technology and Biotechnology, Zagreb, Kroasia.

- Do, Quy Diem., Angkawijaya, Artik Elisa., Tran-Nguyen, Phuong Lan. Huynh, Lien Huong., Soetaredjo, Felycia Edi., Ismadji, Suryadi., Ju, Yi-Hsu. 2014. *Effect of Extraction Solvent on Total Phenol Content, Total Flavonoid Content, and Antioxidant Activity of Limnophila aromatic.* Journal of Food and Drug Analysis Vol. 22, pp. 296-302.
- Dutta, Sumana., Sanjib, Ray. 2014. *Evaluation of Antioxidant Potential of Leaf Aqueous and Methanolic Extracts of Calophyllum inophyllum in Relation of Total Phenol and Flavonoid Contents.* International Journal of Pharma and Bio Sciences Vol. 5 (3), July, pp. 441-450.
- Gordon, M.H., *The Mechanism of Antioxidant Action in Vitro.* Food Antioxidants Elsevier Applied Food Science 1990.
- Gulcin, Ilhami. 2011. *Antioxidant activity of food constituents: an overview.* Jerman.
- Irawati, dkk. 2014. “Ekstraksi Senyawa Fenolik dari Rambut Jagung sebagai Antioksidan Alami: Pengaruh Konsentrasi Etanol dan Waktu Maserasi”, Surabaya, Indonesia.
- Jensen, w.B., *The Origin of the Soxhlet Extractor.* Journal of Chemical Education, 2007.
- Katsube, Takuya., Tabata, Hiromasa., Ohita, Yukari., Yamasaki, Yurikazu., Anuurad., Erdembileg., Shiwaku, Kunikori., Yamane, Yosuke. 2004. *Screening fro Antioxidant Activity in Edible Plant Product: Comparison of Low-Density Lipoprotein Oxidation Assay, DPPH Radical Scavenging Assay, and Folin-Ciocalteu Assay.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, Shimane, Jepang.
- Lester, Gene E., Lewers, Kim S., Medina, Marjorie B., Saftner, Robert A. 2012. *Comparative Analysis of Strawberry Total Phenolics via Fast Blue BB vs. Follin-Ciocalteu:*

- Assay Interference by Ascorbic Acid*. Journal of Food Composition and Analysis Volume 27, pp. 102-107.
- Lobo, V., et al., *Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health*. Pharmacogn Rev, 2010.
- Maja Dent, dkk. 2013. *The Effect of Extraction Solvents, Temperature and Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols in Dalmatian Wild Sage (Salvia officinalis L.) Extracts*, Croatia.
- Markham. K.R. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, terjemahan K. Radmawinata. Penerbit ITB. Bandung.
- Medina, Marjorie B. 2011. *Simple and Rapid Method for The Analysis of Phenolic Compounds in Beverages and Grains*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Amerika Serikat.
- P., Malarvizhi, N., Ramakrishnan. 2011. *GC-MS Analysis of Biologically Active Compounds in Leaves of Calophyllum inophyllum L.* Department of Botany, Government Arts College (Autonomous), Tamil Nadu, India.
- Pratiwi, E., *Perbandingan Metode Maserasi, Remaserasi, Perkolasi dan Reperkolasi dalam Ekstraksi Senyawa Aktif Andrographolide dari Tanaman Sambiloto (Andrographis paniculata (Burm.F.) Nees)*, 2010, Bogor Agricultural University, Bogor
- Rahardjo, A. and F. Salim, *Ekstraksi Senyawa Fenolik dari Daun Sirih Untuk Antioksidan Antibakteri Alami dengan Metode Ultrasound-Assisted Extraction*, 2013, Universitas Katolik Widya Mandala, Surabaya
- Sharma, Kavita., Ko, Eun Young., Assefa, Awraris D., Ha, Soyoung., Nile, Shivraj H., Lee, Eul Tai., Park, Se Won. 2014. *Temperature-dependent Studies on The Total Phenolics, Flavonoids, Antioxidant Activities, and Sugar Content in Six Onion Varieties*. Department of Bioresources and Food Science, Konkuk University, Seoul, Republik Korea.

- Sulianti, Sri Budi., Kuncari, Emma Sri., Chairul, Sofnie M. 2005. *Pemeriksaan Farmakognosi dan Penapisan Fitokimia dari Daun dan Kulit Batang Calophyllum inophyllum dan Canophyllum soulatri*. Biodiversitas Vol. 7 (1), 30 Juni, pp. 25-29.
- Sumana dan Sanjib. 2014. *Evaluation of Antioxidant Potentials of Leaf Aqueous and Methanolic Extracts of Calophyllum inophyllum Relation to Total Phenol and Flavonoid Contents*, West Bengal, India.
- Sun, Chunli., Wu, Zhengshuang., Wang, Ziyang., Zhang, Hongcheng. 2015. *Effect of Ethanol/Water Solvents on Phenolic Profiles and Antioxidant Properties of Beijing Propolis Extract*. Journal of Food Quality, Hindawi Publishing Corporation.
- Teissedre, dkk. 2013. *Evolution of Analysis of Polyphenols from Grapes, Wines, and Extracts*, Prancis.
- Tosco, Paolo., dkk. 2008. *Structure-Antioxidant Activity Relationships in a Series of NO-Donor Phenols*. Jerman.
- Van Ngo, Thanh., Scarlett, Christopher James., Bowyer, Michael Christian., Duc Ngo, Phuong., Van Vuong Quan. 2017. *Impact of Different Extraction Solvents on Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity from The Root of Salacia chinensis L.* Journal of Food Quality, Hindawi Publishing Corporation.
- Zlotek, Urszula., Mikulska, Sylwia., Nagajek, Malgorzata., Swieca, Michal. 2015. *The Effect of Different Solvents and Number of Extraction Steps on The Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Basil Leaves (Ocimum basilicum L.) Extracts*. Saudi Journal of Biological Sciences.

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Judul

Judul penelitian yang dilakukan penulis adalah “Pengaruh Jenis Pelarut dan Temperatur terhadap *Total Phenolic Content*, *Total Flavonoid Content*, dan aktivitas antioksidan di Ekstrak Daun Nyamplung (*Calophyllum inophyllum*)”.

I.2 Latar Belakang

Pemanfaatan tanaman sebagai obat merupakan cara tradisional untuk menyembuhkan penyakit tanpa penambahan senyawa kimia sintesis. Di jaman modern ini, penggunaan obat tradisional masih mendapatkan tempat di hati masyarakat. Penyebabnya pun beragam: karena obat tradisional mudah didapatkan dan diolah, harganya lebih murah daripada obat, dan bahan baku obat tradisional dapat ditanam sendiri di rumah (Sulianti, 2005). Namun demikian, manfaat obat tradisional masih dapat dinikmati secara praktis karena sudah terdapat dalam bentuk kapsul maupun *sachet* di pasaran. Dari beragam jenis tanaman yang dapat digunakan sebagai bahan baku obat, nyamplung merupakan salah satu tanaman yang memiliki banyak khasiat dalam menyembuhkan penyakit.

Nyamplung (*Calophyllum inophyllum*) merupakan tanaman bakau yang tersebar hampir di seluruh daerah tropis di Asia, Australia, dan Afrika Timur (Allen, 2006). Di Indonesia, tanaman nyamplung mudah ditemui di pesisir pantai Jawa, Sumatera, Nusa Tenggara, Sulawesi, dan Bali. Sebagai tanaman obat, hampir semua bagian nyamplung berkhasiat dalam menyembuhkan luka, meredakan iritasi mata, dan mencegah penyakit jantung (Aparamarta et al., 2016). Tidak hanya itu, nyamplung juga mengandung minyak yang baik bagi kulit karena kandungan Vitamin E yang besar. Oleh karena banyak manfaatnya dalam menyembuhkan penyakit, dan dalam dunia kesehatan, maka penelitian mengenai tanaman nyamplung mulai berkembang,

Tujuan utamanya adalah untuk mengetahui senyawa bioaktif yang terkandung dalam nyamplung. Salah satu penelitian tentang nyamplung yang sedang berkembang adalah penelitian terhadap daun nyamplung.

Daun nyamplung berbentuk elips dengan permukaan yang mengkilat. Secara tradisional, daun nyamplung umumnya digunakan untuk mengobati ruam pada kulit, mengobati luka dan iritasi pada mata. Selain itu, daun nyamplung yang sudah dikeringkan dapat digunakan sebagai obat reumatik. Daun nyamplung mempunyai berbagai macam karakteristik obat, seperti antimikroba, antioksidan, analgesik, anti-kanker, dan *HIV1 integrase* (Dutta dan Ray, 2014). Penelitian mengenai daun nyamplung sudah banyak dilakukan, dan berdasarkan studi literatur yang dilakukan, penelitian berfokus pada analisa kandungan fitokimia daun nyamplung, analisa karakteristik obat daun nyamplung (contoh: aktivitas antioksidan, anti-kanker, dsb), dan analisa senyawa bioaktif yang terkandung di daun nyamplung. Dalam menganalisa senyawa maupun karakteristik obat daripada daun nyamplung, metode yang umum dilakukan adalah metode ekstraksi dengan pelarut (*solvent extraction*).

Dutta dan Ray (2014), dalam jurnalnya, menjelaskan potensi antioksidan dari ekstrak daun nyamplung dalam relasinya dengan total kandungan fenol dan flavonoid. Pada penelitian tersebut, daun nyamplung diekstraksi dengan dua jenis pelarut (air dan methanol) dan didapatkan bahwa kedua ekstrak mengandung senyawa fitokimia yang sama. Beberapa senyawa tersebut termasuk diantaranya senyawa tannin, terpenoid, alkaloid, flavonoid, dan sebagainya. Jaikumar *et al* (2016), dalam penelitiannya, menyebutkan bahwa ekstrak daun nyamplung, dengan pelarut etanol, menghasilkan beberapa senyawa anti-kanker payudara. Ekstrak tersebut dianalisa menggunakan GC-MS, dan didapatkan berbagai senyawa dengan *peak area* (%) masing-masing. Salah satu senyawa dengan *peak area* terbesar (51,20%) adalah n-Heptana, 1,1-bi(4,4-dimethylhexan-2,6-dione-1-yl). Ekstrak daun nyamplung juga dievaluasi kemampuannya

dalam melawan sel kanker menggunakan *micro-culture MTT assay*. Dari evaluasi tersebut, senyawa bioaktif dalam ekstrak daun nyamplung tersebut terbukti dapat melawan sel MCF-7, yang merupakan sel kanker payudara.

Berbeda dengan kedua penelitian sebelumnya, Tsai *et al* (2012) meneliti pengaruh senyawa anti-iritasi (*anti-inflammatory*) daripada nyamplung terhadap sel RAW264.7. Sel RAW264.7, pada penelitian ini, berfungsi sebagai sel induk yang merepresentasikan sel tubuh yang terkena iritasi. Secara teknis, sel RAW264.7 diinduksi dengan senyawa NO dan COX-2 (senyawa yang merangsang inflamasi), dan ekstrak daun nyamplung diinjeksikan ke dalam sel tersebut. Ekstrak daun nyamplung diperoleh dari hasil ekstraksi menggunakan pelarut aseton. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa ekstrak daun nyamplung dapat menurunkan kadar NO dan COX-2. Hal itu disebabkan oleh kandungan senyawa flavonoid dalam ekstrak daun nyamplung. Terdapat dua senyawa flavonoid utama dalam ekstrak daun nyamplung tersebut, yaitu amentoflavone dan asam linoleat. Senyawa flavonoid bekerja berperan dalam menghambat produksi NO di dalam sel dan menekan senyawa penyebab COX-2 (*COX-2 promoter*). Karena kemampuannya tersebut, ekstrak daun nyamplung memiliki sifat anti-inflamasi yang tergolong kuat.

Pada penelitian ini, daun nyamplung akan diuji berdasarkan total kandungan fenol (*Total Phenolic Content*, TPC), total kandungan flavonoid (*Total Flavonoid Content*, TFC), dan aktivitas antioksidan melalui analisa DPPH (*1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl*). Analisa yang digunakan sama seperti penelitian yang dilakukan oleh Diem Do *et al* (2013) dengan menggunakan metode ekstraksi oleh berbagai jenis pelarut, konsentrasi dan suhu. Penelitian ini menggunakan tiga jenis pelarut dengan konsentrasi yang berbeda. Pelarut yang digunakan antara lain: methanol (kadar 50%, 80%, dan 100%), etanol (kadar 50%, 80%, dan 100%), dan aseton (kadar 50%, 80%, dan 100%). Selain pelarut, pengaruh temperatur pada saat ekstraksi juga diteliti untuk mendapatkan

temperatur optimum pada saat ekstraksi, untuk setiap variabel pelarut. Temperatur yang digunakan adalah 30°C, 45°C, dan 60°C.

I.3 Rumusan Masalah

Dari latar belakang yang telah dijelaskan, rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bagaimana pengaruh jenis pelarut, dalam ekstraksi daun nyamplung, terhadap analisa TPC, TFC, dan DPPH?
2. Bagaimana pengaruh temperatur, dalam ekstraksi daun nyamplung, terhadap analisa TPC, TFC, dan DPPH?

I.4 Batasan Masalah

Batasan masalah diperlukan agar penelitian tidak menyimpang dari ketentuan yang ditetapkan. Adapun batasan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Daun nyamplung yang digunakan sudah berupa bubuk.
2. *Pretreatment* daun nyamplung menggunakan ekstraksi dengan n-heksana, untuk menghilangkan fraksi non-polar di daun nyamplung.

I.5 Tujuan Penelitian

Tujuan daripada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui pengaruh jenis pelarut, dalam ekstraksi daun nyamplung, terhadap analisa TPC, TFC, dan DPPH.
2. Mengetahui pengaruh temperatur, dalam ekstraksi daun nyamplung, terhadap analisa TPC, TFC, dan DPPH.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Kondisi Tanaman Nyamplung (*Calophyllum inophyllum*) di Indonesia

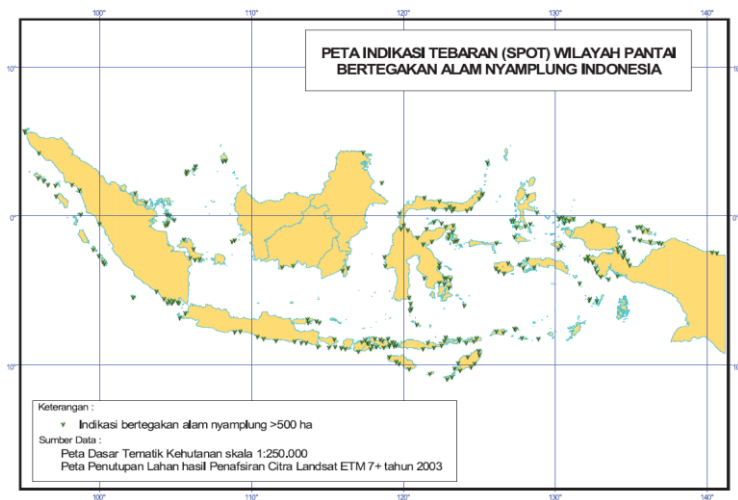
Tanaman nyamplung (*Calophyllum inophyllum*) merupakan salah satu jenis tanaman mangrove yang mulai dikembangkan penanamannya di Indonesia pada tahun 1950. Sebagai tanaman mangrove, nyamplung berfungsi sebagai pelindung pantai dari abrasi, penahan angin dari laut ke darat, penahan gelombang pasang, penahan tebing sungai dan pantai dari longsor serta penjaga kualitas air payau. Namun jumlah tanaman nyamplung turut mengalami penurunan setiap tahunnya seiring dengan kondisi hutan mangrove di Indonesia yang semakin memprihatinkan, dimana 40% hutan mangrove per tahun mengalami kerusakan (Campbell dan Brown, 2015). Penyebab utama hilangnya mangrove dikarenakan adanya alih fungsi lahan menjadi tambak udang, perkebunan kelapa sawit serta pembangunan pedesaan maupun perkotaan (malut.litbang.pertanian.go.id). Padahal selain fungsinya dalam menjaga stabilitas pantai, tanaman nyamplung memiliki banyak manfaat yang besar baik sebagai sumber energi nabati terbarukan maupun sebagai obat.

II.2 Persebaran Tanaman Nyamplung (*Calophyllum inophyllum*) di Indonesia

Tanaman nyamplung mempunyai sebaran yang cukup luas di dunia yakni meliputi Madagaskar, Afrika Timur, Asia Selatan dan Tenggara, Kepulauan Pasifik, Hindia Barat, dan Amerika Selatan. Di Indonesia, persebarannya meliputi daerah Sumatera Barat, Riau, Jambi, Sumatera Selatan, Lampung, Jawa, Kalimantan Barat, Kalimantan Tengah, Sulawesi, Maluku hingga Nusa Tenggara Timur dan Papua (Bustomi *et al*, 2008).

Menurut Leksono *et al*, (2011) tanaman nyamplung di pulau Jawa pada umumnya tumbuh di daerah pantai berpasir (0 m

dpl.) juga pada tanah mineral sampai ketinggian 150 m dpl. Nyamplung tumbuh paling dekat pada posisi 50 – 1000 m dari bibir pantai dengan kerapatan pohon sangat bervariasi. Peta sebaran nyamplung di pulau Jawa pada umumnya berdekatan dengan pantai selatan dan pantai barat pulau Jawa, yang mempunyai karakteristik fisik lahan dalam klasifikasi sistem dataran laut dan pantai, sistem dataran, sistem bukit kapur, sistem pesisir pantai yang bergelombang, tipe batuan sedimen pasir serta tipe batuan kapur yang terbentuk dari endapan muara dan endapan vulkanik.



Gambar II.1 Persebaran Tanaman Nyamplung di Indonesia
(www.litbang.pertanian.go.id)

II.3 Morfologi Nyamplung (*Calophyllum inophyllum*)

Tanaman nyamplung (*Calophyllum inophyllum*) merupakan tanaman berkayu dengan tinggi pohon dapat mencapai 25 m dan diameter 150 cm. Tanaman ini kerap kali dikaitkan dengan tanaman hias karena mempunyai daun yang menarik, bunga yang berbau harum, dan bentuk yang indah, sehingga tidak dapat dipungkiri bahwa nyamplung dibudidayakan untuk

dijadikan tanaman hias. Nyamplung mempunyai batang yang keras, kuat, dan tahan terhadap tekanan. Seringkali, batang nyamplung digunakan sebagai bahan konstruksi, bahan pembuatan perahu, bahan pembuatan alat musik, dan untuk kerajinan tangan. Bunga nyamplung berwarna putih dengan lebar sekitar 25 mm dan berada dalam satu tangkai dengan 4 hingga 15 bunga. Buah nyamplung berwarna hijau, berbentuk bulat dengan diameter sekitar 2 hingga 4 cm, termasuk di dalamnya *pulp*, kulit buah, dan bijinya. Biji nyamplung, yang diperoleh dari buah nyamplung, mengandung minyak sebesar 70,4%. Minyak hasil ekstraksi biji nyamplung tersebut berwarna hijau kehitaman dan kental dan biasa digunakan sebagai bahan bakar lampu minyak, obat-obatan, dan minyak rambut (Allen, 1989). Selain itu, minyak nyamplung juga mengandung Vitamin E yang berkhasiat sebagai *anti-aging* bagi kulit, sehingga saat ini banyak dijual minyak nyamplung (*tamanu oil*) sebagai bahan kosmetik. Dalam penelitian terbaru, minyak nyamplung dapat dimanfaatkan juga sebagai bahan baku biodiesel karena mengandung triasilgliserol (TAG) sebesar 78,3% (Aparamarta, 2016).



Gambar II.2 Tanaman Nyamplung (*Calophyllum inophyllum*)
(www.google.com)

II.4 Manfaat Tanaman Nyamplung (*Calophyllum inophyllum*)

Penduduk lokal sering menggunakan tanaman nyamplung sebagai penyangga mata pencaharian, baik untuk kayu bakar, material bangunan, produksi arang, bubur kertas ataupun sebagai obat-obatan. Beberapa bagian dari nyamplung yang digunakan sebagai obat-obatan antara lain getah untuk menyembuhkan luka, kulit batang sebagai bahan antiseptik dan desinfektan, akar untuk menyembuhkan luka dan penyakit jantung, dan daun untuk mengobati iritasi pada mata (Aparamarta, 2016). Penggunaan nyamplung sebagai obat-obatan tidak terlepas dari kandungan senyawa bioaktif yang terdapat di tanaman nyamplung. Hasil penelitian menunjukkan bahwa nyamplung memiliki senyawa bioaktif yang berperan dalam menyembuhkan penyakit. Beberapa senyawa bioaktif tersebut meliputi senyawa xanthone, coumarin, biflavonoid, chalcone benfluran, dan triterpene (Malarvizhi dan Ramakrishnan, 2011). Senyawa bioaktif yang terkandung dalam nyamplung dapat dimanfaatkan lebih lanjut sebagai bahan baku obat-obatan. Sebagai contoh, saat ini senyawa xanthone merupakan senyawa yang berperan dalam mengoobati kanker dan sedang dikembangkan sebagai obat anti HIV (Morton, 2005).

II.5 Ekstraksi dengan Pelarut

Dalam tanaman, terdapat berbagai macam senyawa bioaktif dengan sifat kimia yang berbeda, sehingga untuk mendapatkan senyawa satu dengan lainnya dapat digunakan pelarut yang berbeda pula (Do *et al*, 2013). Beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam melakukan proses ekstraksi pelarut yaitu jenis pelarut, sistem pelarut, dan kondisi temperatur yang digunakan karena memiliki pengaruh terhadap *yield* ekstrak sehingga diperoleh hasil yang maksimal.

II.5.1 Jenis Pelarut

Senyawa yang terkandung dalam tanaman dapat dikategorikan berdasarkan polaritasnya: senyawa polar dan non-polar, sehingga penting untuk mengetahui karakteristik dari senyawa yang akan diisolasi. Pada analisa senyawa

fenolik, pelarut polar lebih sering digunakan, terutama dalam *recovery* polifenol dalam matriks tanaman. Pelarut yang paling umum digunakan adalah etanol, metanol, aseton dan etil asetat. Etanol merupakan pelarut yang baik digunakan dalam ekstraksi polifenol dan aman dikonsumsi. Metanol baik digunakan dalam ekstraksi senyawa polifenol dengan berat molekul yang lebih ringan. Sedangkan aseton baik digunakan dalam ekstraksi senyawa flavanol dengan berat molekul yang lebih besar (Do *et al*, 2013).

II.5.2 Sistem Pelarut

Menurut Sun dan Ho 2005; Turkmen *et al*, (2006), umumnya, untuk ekstraksi polifenol atau senyawa bioaktif lainnya dari tanaman, kombinasi pelarut organik dan air (etanol, metanol, aseton, dan dietil eter) digunakan (as cited in Nur, 2012). Selama proses ekstraksi berlangsung, persen *recovery* bergantung pada jenis dan sistem pelarut serta metode ekstraksi yang dipakai. Pelarut dengan viskositas rendah memiliki densitas yang rendah namun memiliki sifat difusivitas yang tinggi sehingga dapat berdifusi dengan mudah kedalam pori-pori tanaman untuk mengambil senyawa bioaktif (Naczki dan Shaidi, 2006, as cited in Nur, 2013).

II.5.3 Kondisi Temperatur

Menurut Maja *et al* (2013) berdasarkan penelitiannya terhadap ekstraksi tanaman *sage*, semakin suhu ditingkatkan, *yield* ekstrak yang diperoleh akan semakin banyak, namun ketika melebihi suhu 60°C, *yield* ekstrak lebih sedikit, hal ini dikarenakan terjadinya degradasi pada senyawa bioaktif yang disebabkan adanya peristiwa hidrolisis, reaksi oksidasi dan polimerisasi, selain itu banyaknya senyawa yang tidak diinginkan juga ikut terekstrak. Oleh karena itu pemilihan kondisi temperatur untuk mendapatkan senyawa yang spesifik pada suatu tanaman harus sesuai dengan struktur molekul senyawa yang ingin diekstrak, karakteristik matriks tanaman, dan kecenderungan senyawa tersebut untuk terdegradasi.

II.5.4 Macam Ekstraksi

Sokletasi merupakan ekstraksi secara berkesinambungan, dimana pelarut dipanaskan hingga menguap dan uap pelarut akan terkondensasi menjadi molekul-molekul cair oleh pendingin balik dan turun melarutkan bahan dalam klongsong dan selanjutnya masuk kembali ke dalam labu alas bulat setelah melewati pipa. Keuntungan metode ini adalah dapat digunakan untuk sampel dengan tekstur yang lunak dan tidak tahan terhadap pemanasan secara langsung, memerlukan sedikit pelarut serta pemanasannya dapat diatur. Sedangkan kerugian dari metode ini adalah karena pelarut didaur ulang, ekstrak yang terkumpul pada wadah di sebelah bawah terus-menerus dipanaskan sehingga dapat menyebabkan reaksi peruraian oleh panas.

Fluida superkritis (*Supercritical Fluid*) adalah salah satu teknik ekstraksi dimana pengambilan substansi aktif dari bahan pada keadaan suhu dan tekanan diatas titik kritisnya. Saat substansi berada pada titik kritisnya, substansi tersebut tidak dapat dibedakan fase gas atau fase liquid (Rahmawati dan Pang, 2013).

Maserasi merupakan proses ekstraksi komponen oleh pelarut dengan melakukan perendaman sampel. Maserasi ini cocok untuk mengekstrak komponen-komponen yang tidak tahan akan suhu tinggi. Pada perendaman sampel tumbuhan akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel, sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut. Pelarut yang mengalir ke dalam sel dapat menyebabkan protoplasma membengkak dan bahan kandungan sel akan larut sesuai dengan kelarutannya. Lamanya waktu ekstraksi menyebabkan terjadinya kontak antara sampel dan pelarut lebih intensif sehingga hasilnya juga bertambah sampai titik jenuh larutan. Kontak antara sampel dan pelarut dapat ditingkatkan apabila didukung dengan adanya pengadukan agar kontak antara sampel dan

pelarut semakin sering terjadi sehingga proses ekstraksi lebih sempurna (Koirewoa *et al*, 2008).

II.6 Interaksi Antar Molekul

Substansi polar cenderung larut dalam pelarut polar dan substansi non-polar cenderung larut dalam pelarut non-polar. Ketika suatu solut larut dalam suatu pelarut, partikel dalam solut tersebut akan terpisah dari satu partikel besar menjadi partikel individunya, kemudian bergerak dalam ruang antar partikel-partikel pelarut. Partikel pelarut kemudian bertabrakan dengan partikel individu dari solut tersebut sehingga menyebabkan adanya gaya intermolekul yang saling tarik menarik antar partikel solut dan pelarut (Ernest, 2016). Adapun gaya intermolekul yang saling tarik menarik disebabkan oleh beberapa faktor, yaitu:

a. Ikatan Hidrogen

Substansi tertentu seperti H_2O , HF , NH_3 membentuk ikatan hidrogen sehingga akan mempengaruhi properti pada substansi lain baik dalam campurannya maupun pada senyawa murninya. Senyawa lain yang memiliki gugus $-\text{OH}$ dan $-\text{NH}_2$ seperti senyawa organik baik alkohol, asam amino, maupun senyawa amina juga akan membentuk ikatan hidrogen.

b. Gaya antar dipol

Dua dipol dapat merasakan ikatan dalam jarak tertentu. Mekanisme gaya antar dipol melibatkan sisi akhir positif pada dipol pertama akan tertarik oleh sisi akhir negatif pada dipol kedua yang kemudian akan mengusir sisi akhir positif pada dipol kedua.

c. Gaya van der Waal

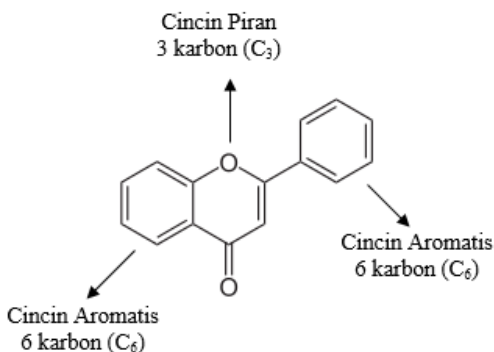
Gaya ini selalu ada pada semua substansi. Gaya tersebut muncul akibat dari induksi dipol dimana interaksi tersebut lebih lemah daripada interaksi antar dipol-dipol. Secara umum, semakin besar molekul maka semakin besar gaya van der Waal.

(www.science.uwaterloo.ca)

II.7 Senyawa Fenolik

Merupakan senyawa yang terdiri atas molekul-molekul besar dengan beragam struktur dimana karakteristik utama pada senyawanya memiliki gugus hidroksil (-OH) yang terikat langsung dengan cincin hidrokarbon aromatik yang umumnya dapat ditemukan diberbagai jenis tanaman. Senyawa fenolik memiliki kemampuan antiseptik yang tinggi dan dapat berfungsi sebagai antibakteri. Karena kemampuan senyawa fenolik yang cenderung menyembuhkan, senyawa fenolik memiliki peran penting untuk mencegah timbulnya penyakit pada tanaman akibat dari peristiwa oksidasi maupun terhadap serangan patogen sehingga dapat dikatakan sebagai senyawa antioksidan.

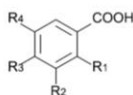
Senyawa ini dapat diklasifikasikan menjadi dua kelompok utama, flavonoid dan non-flavonoid. Senyawa flavonoid merupakan senyawa fenolik yang paling berlimpah. Flavonoid memiliki penyusunan cincin aromatis yang berbeda, Dua cincin aromatis (terdiri dari ikatan 6 karbon) dihubungkan oleh ikatan 3 karbon yang membentuk suatu cincin piran (cincin heterosiklik yang mengandung oksigen), oleh karena itu struktur flavonoid disebut sebagai $C_6-C_3-C_6$ (Lou *et al*, 2007).



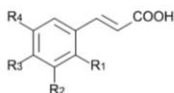
Gambar II.3 Struktur Kimia Senyawa Flavonoid

Senyawa non flavonoid, merupakan kelompok dari asam hidroksibenzoat, asam hidroksi sinamat dan stilben. Struktur kimianya berdasarkan dari karbon ke enam sampai ke satu, dimana cincin benzene dengan enam karbon memiliki satu karbon rantai alifatik substituen. Berbagai senyawa asam ini dibedakan berdasarkan substituenya terhadap satu karbon tersebut. Senyawa seperti asam galat, asam vanilla, asam coumarin merupakan senyawa non-flavonoid yang umumnya dapat ditemukan diberbagai jenis tanaman (Lorrain *et al*, 2013).

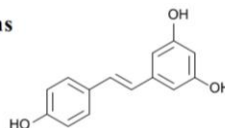
Hydroxybenzoic acids



Hydroxycinnamic acids



Stilbens



Gambar II.4 Struktur Dasar Senyawa Non-flavonoid

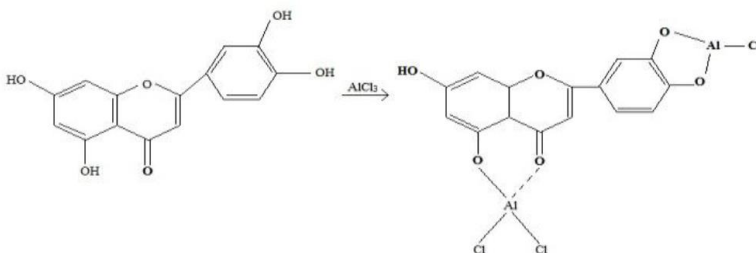
II.8. Total Kandungan Fenolik

Metode Folin-Ciocalteu merupakan metode yang umum digunakan untuk mengetahui total jumlah senyawa fenolik yang terkandung pada tanaman. Metode ini melibatkan oksidasi dari larutan alkalin (biasanya senyawa natrium karbonat) terhadap senyawa fenol dengan pengukuran kolorimetri dari reagen *molybdotungstophosphoric heteropolyanion* berwarna kuning menjadi berwarna biru. Daya serap maksimum yang dimiliki oleh reagen yang berubah warna menjadi biru tersebut bergantung pada kandungan senyawa fenolik yang ada pada tanaman baik secara kualitatif ataupun kuantitatif (Lattanzio, *et al*, 2009).

II.9. Total Kandungan Flavonoid

Pada pengukuran kadar flavonoid dilakukan penambahan AlCl_3 yang dapat membentuk senyawa kompleks, sehingga terjadi pergeseran panjang gelombang ke arah *visible* (nampak) ditandai dengan larutan menghasilkan warna yang lebih kuning. Reaksi antara AlCl_3 dengan golongan flavonoid membentuk kompleks

antara gugus hidroksil dan keton yang bertetangga yang tahan asam atau dengan gugus ortohidroksil yang tidak tahan asam dan bertetangga seperti pada gambar II.4 (Markham, 1988).



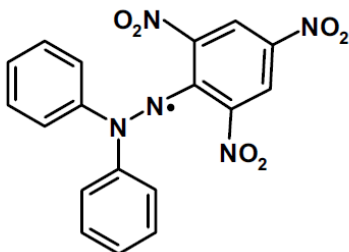
Gambar II.5. Reaksi Kompleks Flavonoid dengan AlCl_3

II.10. Aktivitas Antioksidan

Antioksidan adalah molekul yang cukup stabil yang mampu menetralkan radikal bebas (Lobo, *et al*, 2010). Sesuai mekanisme kerjanya, antioksidan memiliki fungsi utama yaitu sebagai pemberi atom hidrogen sehingga sering disebut antioksidan primer. Senyawa ini dapat memberikan atom hidrogen secara cepat ke senyawa radikal (R^* , ROO^*) atau mengubahnya ke bentuk lebih stabil, sementara turunannya yaitu radikal antioksidan (A^*) memiliki keadaan lebih stabil dibanding senyawa radikal (R^* , ROO^*) dikarenakan adanya efek resonansi inti aromatik senyawa antioksidan (Gordon, 1990). Secara sederhana, mekanisme yang terjadi yaitu,

Berbagai macam penelitian telah menunjukkan bahwa pengukuran aktivitas antioksidan pada tanaman bergantung pada substansi pada suatu sistem yang diuji. Metode yang umum digunakan untuk mengetahui kemampuan antioksidan yakni dengan metode *free radical scavenging* pada DPPH. DPPH (*1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl*) merupakan senyawa radikal bebas yang stabil. Pada percobaannya, larutan DPPH akan berubah warna menjadi ungu pekat ketika pada mekanisme reaksinya

DPPH menerima molekul hidrogen dari pendonor sehingga menjadikannya senyawa non radikal (Tirzitis dan Bartoz, 2010)



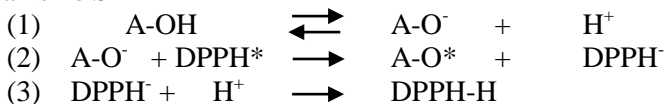
Gambar II.6 Struktur Kimia DPPH Radikal (*1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl*)

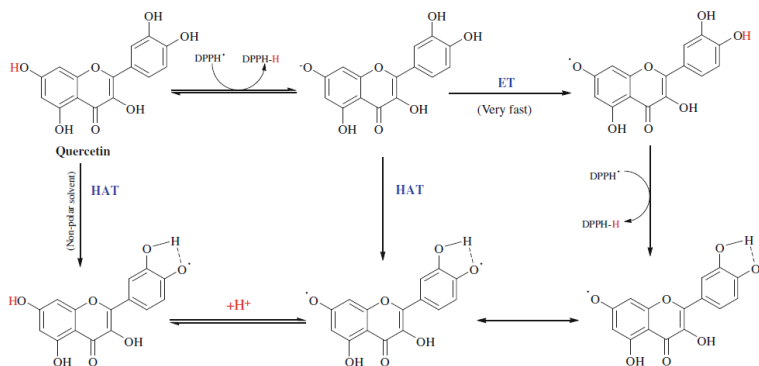
Secara sederhana, mekanisme reaksi yang terjadi antara DPPH dengan senyawa antioksidan dibagi menjadi dua macam yaitu, *Hydrogen Atom Transfer* (HAT) dimana atom hidrogen dari senyawa antioksidan berpindah ke senyawa DPPH, dan *Sequential Proton Loss Electron Transfer* (SPLET) dimana mekanisme reaksi terjadi secara bertahap dengan hilangnya proton (atom hdirogen) terlebih dahulu kemudian dilanjutkan dengan donor elektron terhadap senyawa DPPH (Tosco, *et al*, 2008). Contoh reaksi yang mungkin terjadi antara senyawa fenolik dengan DPPH disajikan pada gambar II.7. Berikut disajikan mekanisme sederhana HAT dan SPLET.

a.) Mekanisme HAT



b.) Mekanisme SPLET





Gambar II.7 Kemungkinan reaksi yang terjadi antara Quercetin dengan DPPH (Ilhami Gulcin, 2011)

II.11. Spektrofotometri

Adapun dalam penentuan total kandungan fenolik, flavonoid maupun pengujian aktivitas antioksidan pada suatu tanaman, seluruh analisisnya diuji dengan menggunakan metode spektrofotometri. Spektrofotometer UV-VIS merupakan alat analisa sampel dengan menggunakan prinsip-prinsip absorpsi radiasi gelombang elektromagnetik oleh bahan untuk panjang gelombang sinar UV sampai dengan sinar tampak. Beberapa komponen spektrofotometer yang penting yaitu: sumber energi radiasi yang stabil, monokromator (celah, lensa, atau cermin), wadah sampel transparan (kuvet), dan detector radiasi yang dilengkapi oleh *recorder*.

Absorpsi radiasi gelombang elektromagnetik ini direkam sebagai absorban. Absorban pada suatu panjang gelombang tertentu didefinisikan sebagai,

$$A = \log \left(\frac{I_0}{I} \right)$$

Dengan A sebagai absorban, I_0 merupakan intensitas berkas cahaya rujukan dan I merupakan intensitas berkas cahaya sampel.

II.12. Penelitian Terdahulu

Beberapa penelitian terdahulu yang turut melatar belakangi penelitian ini adalah:

1. Sumana Dutta *et al* (2009) melakukan penelitian tentang “*Evaluation of Antioxidant Potentials of Leaf Aqueous and Methanolic Extracts of Calophyllum inophyllum in Relation to Total Phenol and Flavonoid Content*”. Pada penelitian ini digunakan satu jenis pelarut yaitu methanol untuk melakukan ekstraksi senyawa antioksidan. Hasil yang didapatkan dari penelitian ini adalah, jumlah total kandungan fenolik serta flavonoid serta kemampuan senyawa antioksidan pada nyamplung.
2. Quy Diem Do *et al* (2010) melakukan penelitian tentang “*Effect of Extraction Solvent on Total Phenol Content, Total Flavonoid Content and Antioxidant Activity of Limnophila Aromatica*”. Pada penelitian ini digunakan berbagai macam pelarut melakukan ekstraksi senyawa antioksidan yaitu methanol, etanol, aseton dan air dengan berbagai macam konsentrasi. Hasil yang didapatkan dari penelitian ini adalah, pelarut terbaik yang dapat menghasilkan total fenolik dan flavonoid terbanyak, sehingga kemampuan antioksidan yang diuji lebih kuat.
3. Maja Dent *et al* (2013) melakukan penelitian tentang “*The Effect of Extraction Solvent, Temperature and Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols in Dalmatian Wild Sage (Salvia officinalis L.) Extracts*”.

(Halaman ini sengaja dikosongkan)

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

III.1 Proses Ekstraksi dan Analisa Kandungan Senyawa Bioaktif

1. Penghilangan senyawa non-polar daun nyamplung dengan ekstraksi solid-liquid
 - a. Solid berupa bubuk daun nyamplung sebanyak 2 kg.
 - b. Pelarut yang digunakan yakni n-heksana teknis sebanyak 6 L.
2. Ekstraksi senyawa antioksidan dengan ekstraksi solid-liquid
 - a. Jenis pelarut yang digunakan yaitu metanol, etanol dan aseton.
 - b. Variabel konsentrasi tiap jenis pelarut yang digunakan yaitu 50; 80; dan 100%.
 - c. Rasio residu solid dengan pelarut sebesar 1:10.
 - d. Variabel temperatur untuk ekstraksi dilakukan pada 30; 45; dan 60°C.
3. Analisa karakteristik senyawa bioaktif pada ekstrak daun nyamplung menggunakan spektrofotometer dengan metode pengujiannya yaitu:
 - a. Metode Follin-Ciocalteu untuk menganalisa total kandungan fenolik
 - b. Metode kolorimetrik alumunium klorida untuk menganalisa total kandungan flavonoid
 - c. Metode *free radical scavenging* untuk menganalisa aktivitas antioksidan

III.2 Bahan dan Peralatan

III.2.1 Bahan

- | | |
|----------------------------|----------------------------|
| 1. Daun nyamplung | 4. Etanol (50, 80, 100%) |
| 2. N-heksana teknis | 5. Aseton (50, 80, 100%) |
| 3. Methanol (50, 80, 100%) | 6. Reagen Follin-Ciocalteu |

- | | |
|---|------------------------|
| 7. Akuades | 12. Alumunium Klorida |
| 8. Natrium Karbonat | 13. Natrium Nitrit |
| 9. Quarcetin | 14. Natrium Hidroksida |
| 10. Asam Galat | |
| 11. DPPH (<i>1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl</i>) | |

III.2.2 Peralatan

- | | |
|------------------------|---------------------|
| 1. Pengaduk magnetik | 5. Termometer |
| 2. <i>Beaker glass</i> | 6. Spektrofotometer |
| 3. Pipet tetes | 7. Cawan |
| 4. Neraca analitik | 8. Kertas saring |

III.3 Metode Penelitian

III.3.1 Bahan Penelitian

Daun nyamplung diperoleh dari Koperasi Jarak Lestari, yang berada di Cilacap, Jawa Tengah. Bahan-bahan kimia seperti n-heksana, metanol, etanol, dan aseton dibeli dari PT. Bratachem; untuk aquades, natrium karbonat, natrium nitrit, alumunium klorida dan natrium hidroksida diperoleh dari Laboratorium Teknologi Biokimia ITS. Komponen standar yang digunakan meliputi asam galat, quarcetin, DPPH dan reagen FC dari Sigma Aldrich.

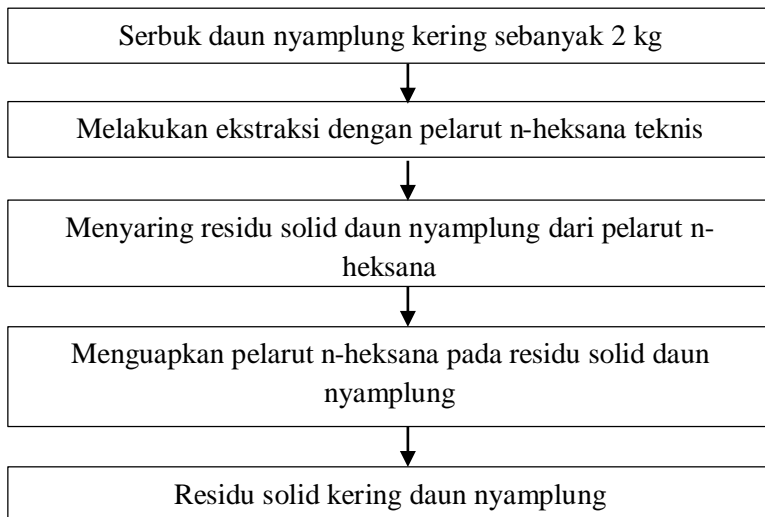
III.3.2 Prosedur Penelitian

III.3.2.1 *Non-polar Removal* Daun Nyamplung

Non-polar Removal daun nyamplung dilakukan dengan metode ekstraksi solid-liquid, dengan tahapan sebagai berikut:

1. 2 kg serbuk daun nyamplung kering direndam dengan 6 L n-heksana teknis selama 3 hari.
2. Campuran solid-liquid disaring, kemudian residu solid hasil ekstraksi dikeringkan hingga pelarut yang tertinggal dalam residu solid teruapkan.
3. Sampel residu solid kering kemudian disimpan pada suhu ruangan.

Skema *non-polar removal* terlihat pada **Gambar III.1**.



Gambar III.1 Skema *Non-polar Removal*

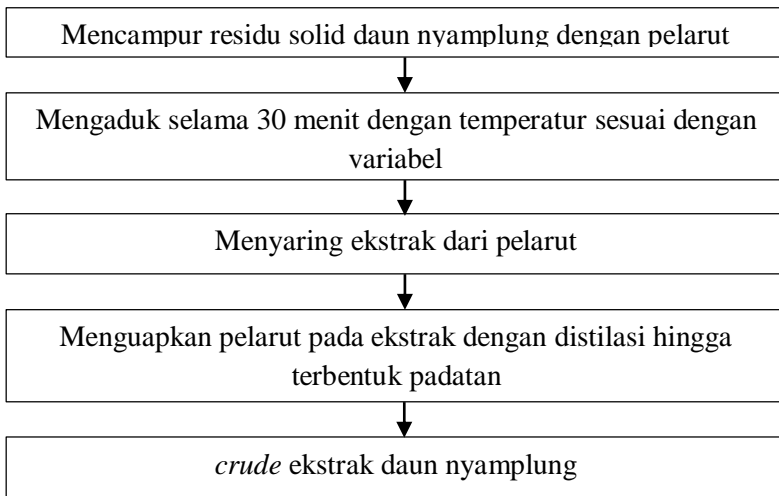
III.3.2.2 Ekstraksi Daun Nyamplung dengan Ekstraksi Solid-Liquid

Residu solid hasil *non-polar removal* diekstrak untuk mendapatkan *crude extract* daun nyamplung. Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan tiga jenis pelarut polar, yaitu metanol, etanol, dan aseton, dengan konsentrasi masing-masing pelarut 50, 80, dan 100%. Perbandingan residu solid dan pelarut sebesar 1:10. Pada kondisi operasinya, berbagai macam temperatur dicoba pada 30; 45; dan 60°C. Adapun prosedur penelitiannya yaitu:

1. 20 g residu solid kering dilarutkan dengan 200 ml untuk masing-masing pelarut (rasio solid dengan pelarut 1:10) kemudian diaduk selama 30 menit dengan temperature diatur sesuai variabel.
2. Dilakukan penyaringan dengan kertas saring untuk memisahkan residu dengan ekstrak.

3. Hasil ekstrak kemudian didistilasi untuk menghilangkan pelarutnya hingga terbentuk padatan kemudian hasil distilasi disimpan pada suhu 4°C.

Berikut skema percobaan untuk mendapatkan ekstrak senyawa antioksidan yang disajikan pada **Gambar III.2** dibawah ini.



Gambar III.2 Skema Ekstraksi Daun Nyamplung

III.3.2.3 Analisa Total Kandungan Fenolik, Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan

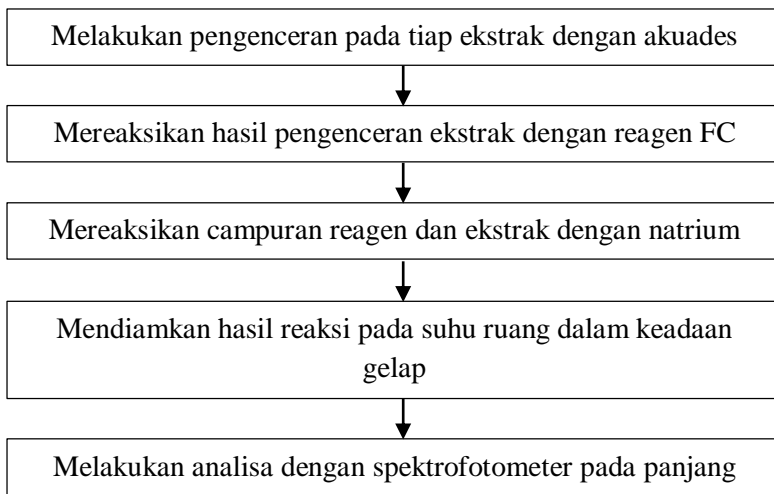
Terdapat tiga jenis metode untuk menganalisa senyawa bioaktif pada ekstrak yang diperoleh pada ekstrak daun nyamplung:

- 1) Metode Folin-Ciocalteu (Analisa Total Kandungan Fenolik)

Total kandungan fenolik pada tiap ekstrak dianalisa menggunakan metode Folin-Ciocalteu oleh Do et al (2013) dengan sedikit modifikasi. Berikut prosedur pengujiannya.

1. Membuat konsentrasi ekstrak menjadi 5mg/L dengan mengencerkan 5 mg ekstrak dengan akuades hingga mencapai 100 ml
 2. 1,6 ml ekstrak hasil pengenceran diambil dan dicampur dengan 0,2 ml reagen Follin-Ciocalteu (pengenceran 1:5 dengan akuades) dan diaduk selama 3 menit
 3. Dilakukan penambahan 0,2 ml natrium karbonat (10% b/v) kemudian diaduk dan didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang dalam keadaan gelap.
 4. Hasil reaksi dianalisa dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 760 nm.
- 2) Kurva kalibrasi larutan standar asam galat.
1. 20 mg asam galat diencerkan dengan akuades hingga 40 ml untuk membuat larutan induk asam galat.
 2. Dibuat larutan standar asam galat dengan konsentrasi 0; 5; 10; 30; dan 60 mg/L dengan mengambil masing-masing larutan induk asam galat sebanyak 0; 1; 2; 6; dan 12 ml dan dimasukkan ke dalam labu takar ukuran 100 ml untuk dilakukan pengenceran dengan akuades hingga mencapai tanda batas.
 3. Diambil masing-masing 1 ml larutan asam galat dan dilakukan reaksi dengan metode Folin-Ciocalteu seperti langkah-langkah sebelumnya.

Hasil dari analisa masing-masing sampel ini dinyatakan dalam satuan mg *Gallic Acid Equivalent* (GAE) per gram ekstrak daun nyamplung. Berikut ini disajikan skema analisa total kandungan fenolik pada gambar **III.3**.



Gambar III.3. Skema Analisa Total Kandungan Fenolik dengan Metode Folin-Ciocalteu

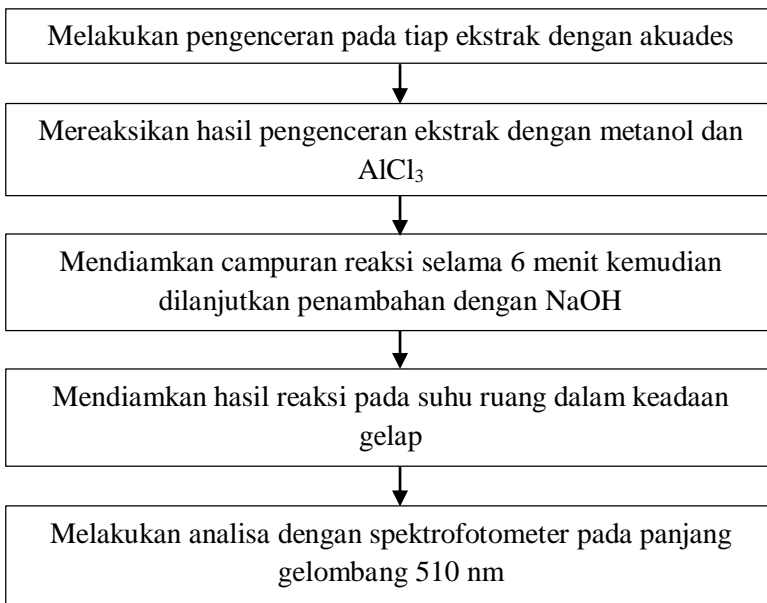
3) Metode Kolorimetrik Alumunium Klorida (Analisa Total Kandungan Fenolik)

Total kandungan flavonoid pada tiap ekstrak dianalisa menggunakan metode AlCl_3 oleh Sumana dan Sanjib (2014) dengan sedikit modifikasi. Berikut prosedur pengujiannya.

1. 1 mg ekstrak ditambahkan dengan akuades hingga mencapai 1 ml kemudian diencerkan dengan akuades hingga 2 ml.
2. Kemudian 1 ml ekstrak hasil pengenceran direaksikan dengan 3 ml natrium nitrit 5%, dan 0.3 ml AlCl_3 10%.
3. Campuran reaksi diaduk dan didiamkan selama 6 menit lalu dilakukan penambahan 2 ml natrium hidroksida (1 M).
4. Hasil seluruh reaksi diencerkan hingga 10 ml total volume dengan penambahan akuades.

5. Didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang dalam keadaan gelap.
 6. Hasil reaksi dianalisa menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 510 nm.
- 4) Kurva kalibrasi larutan standar quercetin.
1. 50 mg quercetin diencerkan dengan 100 ml akuades untuk membuat larutan induk quercetin.
 2. Dibuat larutan standar quercetin dengan konsentrasi 0; 25; 50; 125; dan 250 mg/L dengan mengambil masing-masing larutan induk quercetin sebanyak 0; 5; 10; 25; dan 50 ml dan diencerkan hingga 100 ml dengan akuades menggunakan labu takar.
 3. Diambil masing-masing 1 ml larutan standar quercetin dan direaksikan dengan metode kalorimetrik aluminium klorida seperti pada langkah-langkah sebelumnya.

Hasil dari analisa metode ini dinyatakan dalam satuan mg *Quercetin Equivalent* (QE) per gram ekstrak daun nyamplung. Berikut disajikan skema analisa total kandungan flavonoid pada gambar **III.4**.



Gambar III.4. Skema Analisa Total Kandungan Flavonoid dengan Metode Kolorimetrik Aluminium Klorida.

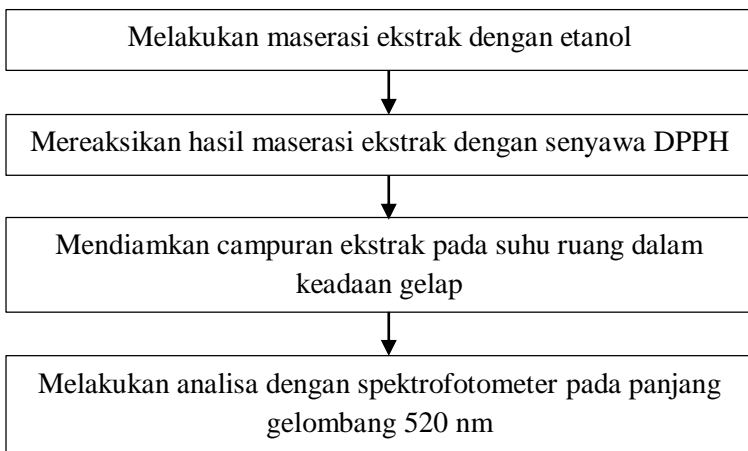
5) Metode *free radical scavenging* dengan DPPH (Analisa Aktivitas Antioksidan)

Analisa aktivitas antioksidan diuji dengan menggunakan metode *free radical scavenging* dengan DPPH sesuai dengan penelitian oleh Sumana dan Sanjib (2014) dengan sedikit modifikasi. Larutan DPPH yang dipakai yakni 0.002% dalam campuran DPPH-metanol. Adapun pengujian dilakukan di Universitas Airlangga, Surabaya. Berikut prosedur penelitiannya:

1. Melakukan maserasi 20-50 mg ekstrak dalam 10 ml etanol
2. 1 ml larutan dimasukkan ke dalam botol vial (terlindung cahaya)

3. Tiap 1 ml larutan direaksikan dengan 3 ml larutan DPPH (40 ppm)
4. Kemudian didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang dalam keadaan gelap.
5. Setelah itu dilakukan analisa menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 520 nm.

Hasil dari analisa ini dinyatakan dalam % inhibisi. Berikut ini disajikan skema analisa aktivitas antioksidan pada gambar **III.5**



Gambar III.5. Skema Analisa Aktivitas Antioksidan

(Halaman ini sengaja dikosongkan)

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh jenis pelarut dan temperatur terhadap *Total Phenolic Content* (TPC), *Total Flavonoid Content* (TFC), dan aktivitas antioksidan di ekstrak daun nyamplung (*Callophyllum inophyllum*). Daun nyamplung yang digunakan terlebih dahulu dihilangkan senyawa non-polarnya (*non-polar removal*) menggunakan metode ekstraksi solid-liquid dengan pelarut N-Heksana. Selanjutnya, daun nyamplung diekstraksi dengan berbagai variasi pelarut dan suhu, sesuai dengan variabel, hingga didapatkan *crude extract* daun nyamplung. Analisa TPC dan TFC dilakukan untuk seluruh *crude extract* daun nyamplung hasil ekstraksi, sedangkan analisa aktivitas antioksidan dilakukan untuk *crude extract* daun nyamplung dengan hasil TPC tertinggi dan TFC tertinggi. Metode analisa yang digunakan pada penelitian ini antara lain metode Folin-Ciocaltau untuk analisa TPC, metode kalorimetrik aluminium klorida untuk analisa TFC, dan metode *free radical scavenging* dengan DPPH untuk analisa aktivitas antioksidan. Data yang diperoleh dianalisa secara statistik menggunakan *analysis of variance* (ANOVA) untuk mengerti seberapa signifikan jenis pelarut dan temperatur mempengaruhi TPC, TFC, dan aktivitas antioksidan ekstrak daun nyamplung.

IV.1. Ekstraksi Daun Nyamplung dengan Ekstraksi Solid-Liquid

Ekstraksi daun nyamplung bertujuan untuk mendapatkan *crude extract* daun nyamplung yang selanjutnya dianalisa kandungan fenolik, flavonoid, dan aktivitas antioksidannya. Sebelum dilakukan ekstraksi, daun nyamplung terlebih dahulu dihilangkan fraksi non-polarnya (*non-polar removal*) dengan cara ekstraksi solid-liquid dengan pelarut N-Heksana. N-Heksana merupakan pelarut organik non-polar, sehingga senyawa non-polar yang terdapat di daun nyamplung terlarut di N-Heksana dan

menyisakan senyawa polar (Dailey dan Vuong, 2015). Daun nyamplung yang digunakan berupa bubuk dengan ukuran 150 mesh. Ekstraksi dengan N-Heksana dilakukan selama 3 hari dan diaduk sesekali agar daun tercampur merata. Setelah ekstraksi dengan N-Heksana, daun nyamplung kemudian dikeringkan sebelum diekstraksi kembali untuk mendapatkan ekstrakya.

Pada proses ekstraksi daun nyamplung, digunakan tiga jenis pelarut (metanol, etanol, dan aseton), dengan tiga konsentrasi berbeda untuk masing-masing pelarut (50, 80, dan 100%), dan tiga kondisi ekstraksi berbeda (30, 45, dan 60°C), sehingga didapatkan 27 sampel *crude extract* daun nyamplung. Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi dengan pelarut. Senyawa bioaktif yang terkandung dalam ekstrak daun nyamplung memiliki tingkat kepolaran yang berbeda, dari yang bersifat sangat polar hingga bersifat non-polar. Pada penelitian ini, senyawa bioaktif yang dijadikan parameter adalah senyawa fenolik dan flavonoid, yang mana keduanya merupakan senyawa polar, sehingga ekstraksi dilakukan dengan menggunakan pelarut polar. Metanol, etanol, dan aseton adalah pelarut yang sering digunakan dalam ekstraksi senyawa bioaktif dari tanaman dan ketiganya bersifat polar. Polaritas pelarut dapat dilihat dari indeks polaritas dan konstanta dielektriknya.

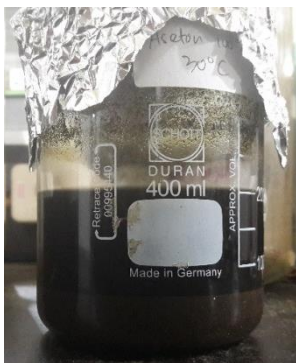
Tabel IV.1.1 Indeks Polaritas Pelarut (Sadek, 2002)

Pelarut	Formula	Indeks Polaritas	Konstanta Dielektrik
Aseton	C_3H_6O	5,1	21,01
Etanol	C_2H_6O	5,2	24,6
Metanol	CH_4O	5,1	32,6
Air	H_2O	9,0	78,54

Indeks polaritas dan konstanta dielektrik merupakan ukuran kepolaran suatu pelarut. Semakin tinggi indeks polaritas dan konstanta dielektrik pelarut, semakin polar pelarut tersebut. Keduanya mempengaruhi kemampuan pelarut dalam ekstraksi,

sehingga penggunaan pelarut yang berbeda menghasilkan senyawa bioaktif yang berbeda, bergantung pada polaritasnya. Konsentrasi pelarut yang digunakan juga mempengaruhi kemampuan pelarut dalam mengekstrak senyawa bioaktif. Air merupakan senyawa polar yang memiliki indeks polaritas dan konstanta dielektrik yang tinggi, sehingga campuran air dengan pelarut memiliki polaritas yang lebih tinggi dibandingkan pelarut murni (Dailey dan Vuong, 2015).

Selain pelarut, temperatur merupakan faktor lain yang mempengaruhi ekstraksi senyawa bioaktif. Senyawa bioaktif merupakan senyawa yang mudah teroksidasi. Temperatur tinggi dan suasana basa dapat menyebabkan senyawa bioaktif terdegradasi. Menurut Dent *et al*, 2012, dalam jurnalnya, temperatur di atas 60°C dapat menyebabkan degradasi senyawa fenolik yang disebabkan oleh hidrolisis, reaksi redoks, dan polimerisasi. Oleh karena itu, suhu optimal diperlukan dalam mengekstrak senyawa bioaktif agar didapatkan *yield* yang tinggi dan kualitas ekstrak terbaik.



(a)



(b)

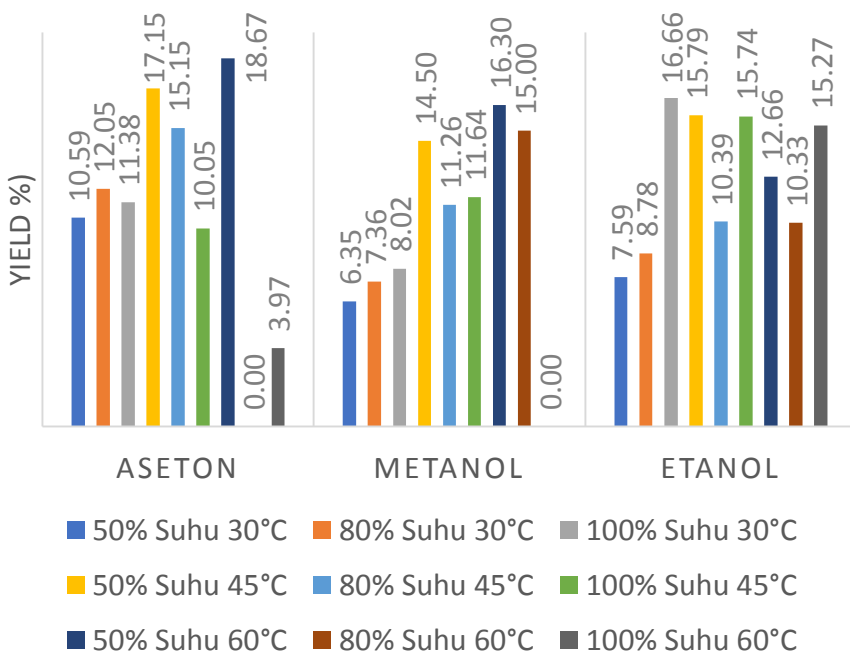
Gambar IV.1.1 (a) Maserasi Daun Nyamplung (b) *Crude Extract* Daun Nyamplung

Pada tahap ini, ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi selama 2 hari dan dilakukan sebanyak 3 kali. Untuk setiap satu kali

maserasi, dilakukan pengadukan selama 30 menit dengan menggunakan *magnetic stirrer*. Pengadukan bertujuan agar pelarut dapat mengikat seluruh komponen polar yang terkandung di daun nyamplung dan panas dapat terdistribusi secara merata. Selain itu, penelitian oleh Zlotek *et al*, 2015, menunjukkan bahwa pengadukan pada saat ekstraksi mempengaruhi *yield* ekstrak dan total kandungan fenolik (TPC). Semakin lama waktu pengadukan, semakin tinggi *yield* ekstrak dan kandungan fenoliknya. Setelah ekstraksi, campuran daun nyamplung dan pelarut disaring, lalu kemudian fraksi liquidnya didistilasi pada suhu 70-80°C untuk menghilangkan sisa pelarut yang terlarut di *crude*. *Crude extract* daun nyamplung berwarna hijau kehitaman dan memiliki bau khas seperti bau teh.

IV.2. Pengaruh Jenis Pelarut dan Temperatur terhadap Yield Ekstrak Daun Nyamplung

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, didapatkan hasil *yield crude extract* daun nyamplung seperti yang terdapat di Gambar IV.2.1.



Gambar IV.2.1 Grafik *Yield Crude Extract* Daun Nyamplung

Yield crude extract daun nyamplung dinyatakan sebagai 100 x (gram *crude extract*/gram daun nyamplung). Berdasarkan penelitian ini, didapatkan bahwa *yield* ekstrak daun nyamplung berkisar antara 3,97% untuk aseton 100% suhu 60°C hingga 18,7% untuk aseton 50% suhu 60°C. Ditinjau dari pelarut yang digunakan, *yield* tertinggi aseton didapatkan pada konsentrasi 50% suhu 60°C (18,67%), *yield* tertinggi metanol didapatkan pada konsentrasi 50% suhu 45°C (14,50%), dan *yield* tertinggi etanol didapatkan pada konsentrasi 100% suhu 45°C (16,66%). Pada temperatur ekstraksi yang sama, sebagian besar pelarut aseton dan metanol dengan konsentrasi 50% menghasilkan *yield* yang tinggi. Sebaliknya, pelarut etanol menghasilkan *yield* yang tinggi pada konsentrasi

100%. Do *et al*, 2014, dalam penelitiannya menjelaskan bahwa pelarut campuran aseton-air dan metanol-air menghasilkan *yield* tinggi. Hal ini disebabkan karena air menambah polaritas dari aseton dan metanol, sehingga pelarut aseton-air dan metanol-air memiliki polaritas yang tinggi. Selain ini, campuran pelarut dengan air memungkinkan adanya senyawa selain fenolik dan flavonoid yang terlarut dalam air, sehingga *yield* yang dihasilkan semakin tinggi. Berbeda dengan aseton dan metanol, semakin tinggi konsentrasi etanol maka semakin tinggi *yield* yang didapatkan. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya dimana *yield* ekstrak cenderung meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi etanol (Sun *et al*, 2015).

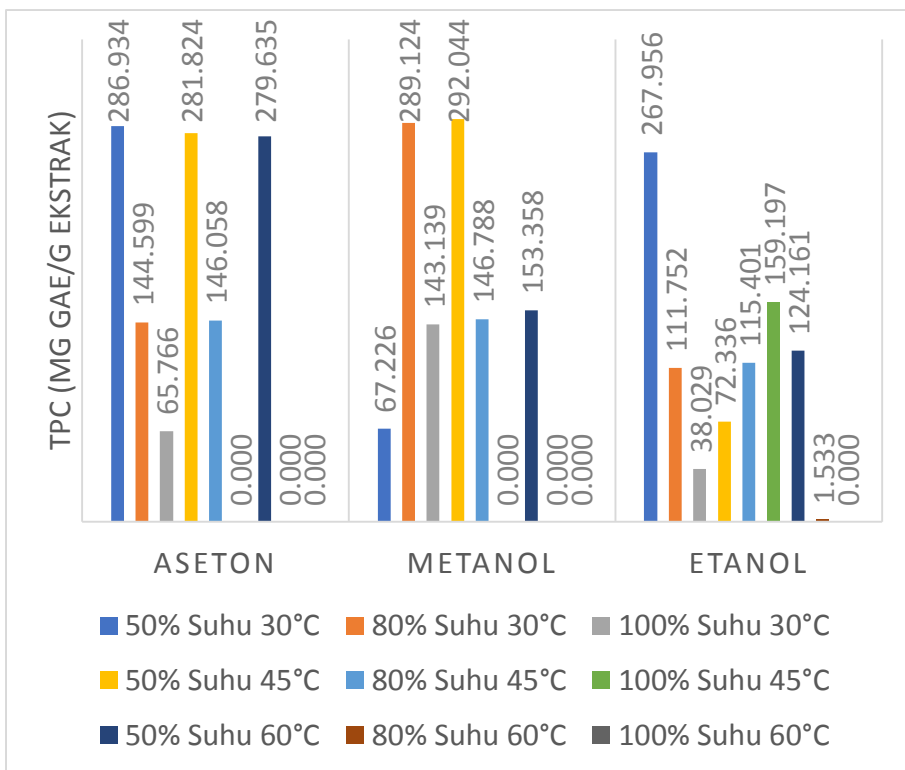
Ditinjau dari temperatur yang digunakan, *yield* tertinggi pada suhu 30°C didapatkan ketika menggunakan pelarut etanol 100% (16,66%), *yield* tertinggi pada suhu 45°C didapatkan ketika menggunakan pelarut aseton 50% (17,15%), dan *yield* tertinggi pada suhu 60°C didapatkan ketika menggunakan aseton 50% (18,67%). *Yield* daun nyamplung dapat terekstrak dengan baik pada suhu 30 dan 45°C. Sedangkan pada suhu 60°C, *crude extract* daun nyamplung tidak didapatkan ketika pelarut aseton 80% dan metanol 100% digunakan. Selain itu, aseton 100% pada suhu 60°C menghasilkan *yield* yang sangat kecil. Hal tersebut terjadi karena suhu ekstraksi lebih tinggi daripada titik didih pelarut, dimana titik didih aseton dan metanol adalah 56°C dan 65°C, sehingga pelarut menguap lebih cepat sebelum terjadi ekstraksi (Sadek, 2002).

Berdasarkan analisa secara statistik, jenis pelarut, konsentrasi pelarut, dan temperatur tidak mempengaruhi *yield crude extract* secara signifikan ($P\text{-value} > 0,05$). Hal tersebut dapat terlihat dari data, bahwa untuk keseluruhan selisih data satu dengan lainnya tidak jauh. Sebagai contoh, *yield* pelarut aseton pada suhu 30°C dengan konsentrasi 50, 80, dan 100% adalah 10,59%, 12,05%, dan 11,38% dan terlihat bahwa beda %*yield* adalah sekitar 1%. Adapun demikian, *yield* yang didapatkan bergantung pada bahan yang diekstrak. Sebagai perbandingan, penelitian oleh Van Ngo *et al*, 2017, mengenai pengaruh variasi pelarut terhadap

ekstraksi *Salacia chinensis* I. menunjukkan bahwa *yield* ekstrak tertinggi didapatkan ketika menggunakan metanol murni, sedangkan penelitian oleh Do *et al*, 2014, mengenai pengaruh jenis pelarut terhadap ekstraksi *Limnophila aromatic* menunjukkan bahwa *yield* tertinggi didapatkan ketika menggunakan pelarut aseton 50%. Pada penelitian ini, hasil *yield* ekstrak daun nyamplung tertinggi didapatkan dengan menggunakan pelarut aseton 50% pada suhu 60°C, dengan %*yield* sebesar 18,67.

IV.3. Pengaruh Jenis Pelarut dan Temperatur terhadap Total Phenolic Content (TPC) di Ekstrak Daun Nyamplung

Analisa *Total Phenolic Content* (TPC) dilakukan menggunakan metode Folin-Ciaoceltau dengan standar asam galat. Metode Folin-Ciaoceltau merupakan metode reaksi kolorimetrik yang sering digunakan dalam analisa TPC. Metode ini menggunakan reagen redoks (reagen Folin-Caoceltau) yang mengandung senyawa kompleks fosfotungstik-fosfomolibdenum, dimana senyawa kompleks tersebut bereaksi dengan senyawa polifenol sehingga dihasilkan warna biru dan kemudian dianalisa dengan *visible-light spectrophotometry*. Absorbansi maksimum sampel bergantung pada pH (dilakukan dalam suasana basa) dan konsentrasi senyawa fenolik yang terkandung dalam ekstrak (Blainski *et al*, 2013). Asam galat merupakan senyawa fenolik yang sering digunakan sebagai standar fenolik dalam analisa TPC. Hasil TPC diperoleh dari kurva kalibrasi asam galat yang diperoleh dengan cara mereaksikan asam galat dengan varian konsentrasi sesuai dengan metode Folin-Ciaoceltau. Absorbansi dilakukan dengan menggunakan spektrofometer UV-VIS pada panjang gelombang 760 nm dan hasil TPC dinyatakan dalam mg *Gallic Acid Equivalent* (GAE) per gram ekstrak daun nyamplung.



Gambar IV.3.1 Grafik Hasil Analisa TPC di Ekstrak Daun Nyamplung

Gambar IV.3.1 menunjukkan hasil analisa TPC di ekstrak daun nyamplung. Hasil TPC diperoleh dari kurva kalibrasi $y = 0,0274x + 0,1739$ dengan $R^2 = 0,9443$, dimana x adalah absorbansi dan y adalah konsentrasi larutan asam galat yang dinyatakan dalam mg GAE/gram ekstrak daun nyamplung. Hasil TPC *crude extract* daun nyamplung berkisar dari 1,533 mg GAE/gram ekstrak untuk etanol 80% suhu 60°C hingga 292,044 mg GAE/gram ekstrak untuk metanol 50% suhu 45°C. Secara umum, pada kondisi temperatur ekstraksi yang sama hasil TPC terbaik didapatkan ketika

menggunakan campuran pelarut-air dengan konsentrasi 50%, namun hasil TPC untuk setiap pelarut berbeda-beda. Ditinjau dari jenis pelarut yang digunakan, *range* TPC dengan pelarut aseton 50% adalah 143,139 mg GAE/gram ekstrak untuk suhu 30°C hingga 286,934 mg GAE/gram ekstrak untuk suhu 30°C, *range* TPC dengan pelarut metanol 50% adalah 67,226 mg GAE/gram ekstrak untuk suhu 30 hingga 292,044 mg GAE/gram ekstrak untuk suhu 60°C, dan *range* TPC dengan pelarut etanol 50% adalah 72,336 mg GAE/gram ekstrak untuk suhu 45°C hingga 267,956 mg GAE/gram ekstrak untuk suhu 30°C. Data tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi pelarut mempengaruhi hasil TPC ekstrak secara signifikan ($P\text{-value} < 0,05$). Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa penggunaan campuran pelarut-air dapat menghasilkan TPC yang tinggi, karena air meningkatkan polaritas dan konstanta dielektrik pelarut sehingga pelarut bersifat semakin polar dan semakin banyak senyawa fenolik yang terlarut. Data juga menunjukkan bahwa jenis pelarut yang digunakan mempengaruhi hasil TPC ekstrak daun nyamplung. Pada konsentrasi dan kondisi temperatur yang sama, sebagian besar hasil TPC dengan pelarut metanol menunjukkan hasil yang paling tinggi dibandingkan pelarut aseton dan etanol. Namun, hasil analisa statistik menunjukkan bahwa jenis pelarut tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap hasil TPC ($P\text{-value} > 0,05$). Hasil TPC tidak sepenuhnya bergantung pada jenis pelarut yang digunakan. Sebagai contoh, Chavan *et al*, 2013, menjelaskan bahwa metanol merupakan pelarut terbaik dalam ekstraksi TPC dari buah *S. chinensis*, sedangkan Dailey dan Vuong, 2015, menjelaskan bahwa etanol dan aseton murni adalah pelarut terbaik dalam ekstraksi TPC dari kulit kacang *macadamia*. Perbedaan ini dapat disebabkan karena perbedaan polaritas pelarut menyebabkan pelarut secara selektif mengekstrak senyawa fenolik hidrofobik dan hidrofilik yang berbeda (Van Nguong *et al*, 2017).

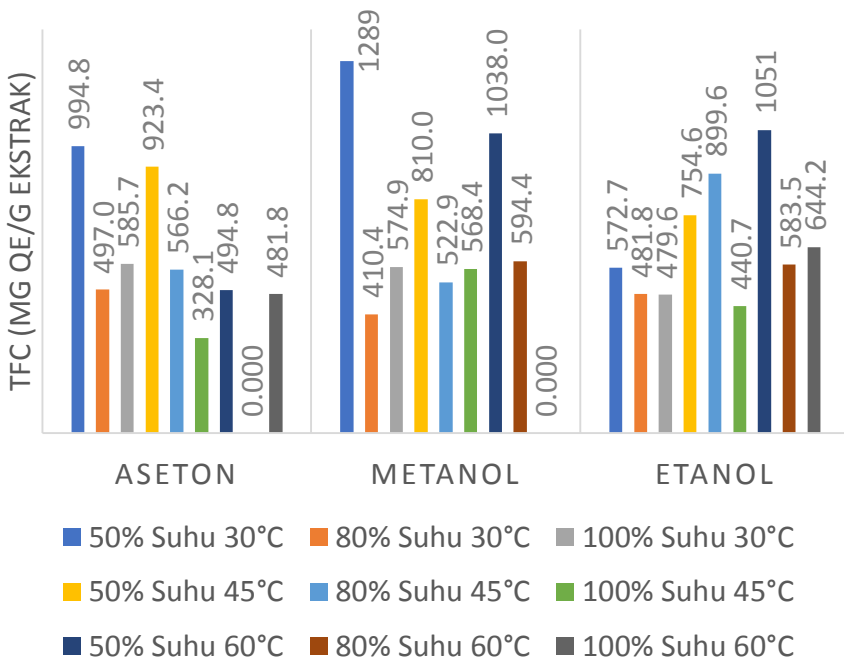
Ditinjau dari suhu yang digunakan, *range* TPC pada suhu 30°C adalah 38,029 mg GAE/gram ekstrak untuk pelarut etanol 100% hingga 289,124 mg GAE/gram ekstrak untuk pelarut

metanol 80%, *range* TPC pada suhu 45°C adalah 0 mg GAE/gram ekstrak hingga 292,044 mg GAE/gram ekstrak untuk pelarut metanol 50%, dan *range* TPC pada suhu 60°C adalah 0 mg GAE/gram ekstrak hingga 286,934 mg GAE/gram ekstrak. Hasil tersebut menunjukkan bahwa temperatur ekstraksi mempengaruhi hasil TPC secara signifikan ($P\text{-value} < 0,05$). Menurut Cariochi *et al*, 2015, semakin tinggi suhu yang digunakan maka hasil TPC dan TFC akan meningkat. Pada penelitian ini, pada suhu 30 dan 45°C, hasil TPC dan TFC meningkat seiring dengan meningkatnya suhu. Pada suhu 60°C, TPC untuk pelarut aseton 100%, metanol 80%, dan etanol 100% tidak terdeteksi. Untuk pelarut aseton dan metanol, suhu 60°C melebihi titik didih kedua pelarut, sehingga menyebabkan pelarut menguap dan tidak dihasilkan ekstrak. Untuk pelarut etanol, TPC tidak terdeteksi pada suhu 60°C karena terjadi degradasi senyawa fenolik karena suhu yang terlalu tinggi. Meskipun demikian, pada suhu 45°C, TPC untuk pelarut aseton 100% dan metanol 100% juga tidak terdeteksi. Data tersebut menjelaskan bahwa pelarut aseton 100% dan metanol 100% tidak mampu atau sedikit melarutkan senyawa fenolik pada suhu 45°C. Adapun demikian, pengaruh suhu terhadap hasil TPC tidak lebih besar daripada pengaruh konsentrasi pelarut, sehingga pemilihan suhu pada saat ekstraksi menitikberatkan pada suhu maksimum senyawa bioaktif agar tidak terjadi denaturasi dan titik didih pelarut. Berdasarkan data yang ditunjukkan, kondisi optimal agar didapatkan hasil TPC yang tinggi adalah dengan menggunakan pelarut metanol dengan konsentrasi 50% pada suhu ekstraksi 45°C dengan TPC sebesar 292,044 mg QE/gram ekstrak.

IV.4. Pengaruh Jenis Pelarut dan Temperatur terhadap Total Flavonoid Content (TFC) di Ekstrak Daun Nyamplung

Analisa *Total Flavonoid Content* (TFC) dilakukan dengan menggunakan metode kalorimetrik aluminium klorida (AlCl_3) dengan standar senyawa quercetin. Metode ini menggunakan

senyawa AlCl_3 sebagai reagen. Pada prinsipnya, AlCl_3 akan membentuk senyawa kompleks asam dengan gugus C-4 keto dan gugus hidroksil C-3 atau C-5 daripada senyawa flavon dan flavonoid. AlCl_3 juga akan membentuk senyawa kompleks tak stabil dengan gugus dihidroksil pada cincin flavonoid A- atau B-. Reaksi kompleks antara AlCl_3 dengan senyawa flavonoid akan menghasilkan warna kuning (Bag *et al*, 2015). Penelitian menunjukkan bahwa senyawa quercetin merupakan standar yang sesuai untuk menentukan TFC pada ekstrak tumbuhan. Analisa dilakukan menggunakan spektrofometer UV-VIS pada panjang gelombang 560 nm dan hasil TFC dinyatakan dalam mg *Quarcetin Equivalent* (QE) per gram ekstrak daun nyamplung. Hasil TFC diperoleh dari kurva kalibrasi standar quercetin yang didapatkan dengan cara mereaksikan quercetin dengan varian konsentrasi sesuai dengan metode kalorimetrik AlCl_3 . Data hasil analisa TFC ditunjukkan pada Gambar IV.4.1.



Gambar IV.4.1 Grafik Hasil Analisa TFC di *Crude Extract* Daun Nyamplung

Hasil TFC diperoleh dari kurva kalibrasi $y = 0,0005x + 0,0124$ dengan $R^2 = 0,9769$, dimana x adalah absorbansi dan y adalah konsentrasi quercetin yang dinyatakan dalam mg QE per gram ekstrak daun nyamplung. Hasil TFC *crude extract* daun nyamplung berkisar pada 328,1 mg QE/gram ekstrak untuk pelarut aseton 100% suhu 45°C hingga 1289 mg QE/gram ekstrak untuk pelarut metanol 50% pada suhu 30°C. Ditinjau dari jenis pelarut yang digunakan, *range* TFC untuk pelarut aseton adalah 328,1 mg QE/gram ekstrak untuk konsentrasi 100% pada suhu 45°C hingga 994,8 mg QE/gram ekstrak untuk konsentrasi 50% pada suhu 30°C, *range* TFC untuk pelarut metanol adalah 410,4 mg QE/gram ekstrak untuk konsentrasi 80% pada suhu 30°C hingga 1289 mg

QE/gram ekstrak untuk konsentrasi 50% pada suhu 30°C, dan *range* TFC untuk pelarut etanol adalah 440,7 mg QE/gram ekstrak untuk konsentrasi 100% pada suhu 45°C hingga 1051 mg QE/gram ekstrak untuk konsentrasi 50% pada suhu 60°C. Secara keseluruhan, hasil TFC tertinggi diperoleh ketika digunakan campuran pelarut-air dengan konsentrasi 50%. Dari data tersebut terlihat bahwa konsentrasi pelarut mempengaruhi hasil TFC, sama halnya dengan TPC. Hasil analisa secara statistik menunjukkan bahwa konsentrasi pelarut mempengaruhi hasil TFC secara signifikan ($P\text{-value}<0,05$). Ditinjau dari jenis pelarut yang digunakan, hasil TFC tidak menunjukkan hasil yang signifikan ($P\text{-value}>0,05$). Seperti TPC, pelarut yang digunakan hanya dapat melarutkan senyawa bioaktif sesuai dengan kemampuannya. Penggunaan kombinasi jenis pelarut dalam satu campuran memungkinkan lebih banyak senyawa polifenol yang terlarutkan. Penelitian oleh Dailey dan Vuong, 2015, menunjukkan bahwa hasil TFC terbesar pada ekstrak kulit kacang *macadamia* diperoleh ketika menggunakan kombinasi metanol, asetonitril, dan air (50%), disusul dengan pelarut metanol dan etanol murni.

Ditinjau dari temperatur ekstraksi, *range* TFC pada suhu 30°C adalah 410,4 mg QE/gram ekstrak untuk pelarut metanol 80% hingga 1289 mg QE/gram ekstrak untuk pelarut metanol 50%, *range* TFC pada suhu 45°C adalah 328,1 mg QE/gram ekstrak untuk pelarut aseton 80% hingga 923,4 mg QE/gram ekstrak untuk pelarut aseton 50%, *range* TFC pada 60°C adalah 481,8 mg QE/gram ekstrak untuk pelarut aseton 100% hingga 1038 mg QE/gram ekstrak untuk pelarut metanol 50%. Hasil analisa secara statistik menunjukkan bahwa temperatur ekstraksi tidak mempengaruhi hasil TFC secara signifikan ($P\text{-value}>0,05$). Sharma *et al*, 2015, menjelaskan bahwa temperatur mempengaruhi senyawa flavonoid secara individual, akan tetapi tidak mempengaruhi total kandungan flavonoid secara keseluruhan. Apabila terjadi fluktuasi hasil TFC, hal tersebut tidak disebabkan oleh temperatur namun pada persiapan bahan sebelum diekstraksi. Apabila dibandingkan antara TPC dan TFC ditinjau dari

temperatur ekstraksi, pada suhu tinggi (60°C), terdapat hasil TPC yang tidak terdeteksi namun hasil TFC terdeteksi. Hal ini disebabkan karena senyawa flavonoid terdegradasi pada suhu 150°C (Sharma *et al*, 2015). Pada penelitian ini, hasil TFC tertinggi didapatkan ketika menggunakan metanol dengan konsentrasi 50% pada suhu 30°C dengan TFC sebesar 1289 mg QE/gram ekstrak.

IV.5. Pengaruh Jenis Pelarut dan Temperatur terhadap Aktivitas Antioksidan di Ekstrak Daun Nyamplung

Analisa aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH *free radical scavenging* dengan asam askorbat (Vitamin C) sebagai standar antioksidan. DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) merupakan senyawa radikal stabil yang sering digunakan dalam mengevaluasi aktivitas antioksidan dari senyawa antioksidan. DPPH memiliki elektron unik yang menyebabkan DPPH dapat menyerap absorbansi pada panjang gelombang 517 nm dan berwarna ungu gelap. Analisa aktivitas antioksidan berdasarkan pada kemampuan DPPH untuk menangkap elektron yang diberikan oleh senyawa antioksidan dan menyebabkan DPPH berubah warna menjadi kuning atau tidak berwarna (Bag *et al*, 2015). Pada penelitian ini, analisa aktivitas antioksidan dilakukan untuk *crude extract* dengan hasil TPC terbaik dan sampel dengan hasil TFC terbaik, yaitu *crude extract* pelarut metanol 50% suhu 45°C dan *crude extract* metanol 50% 30°C. Hal ini dilakukan karena berdasarkan penelitian yang sudah ada, sampel dengan hasil TPC dan atau TFC tinggi akan memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi (Daily dan Vuong, 2015). Penelitian aktivitas antioksidan dilakukan oleh Unit Layanan Pengujian (ULP) Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.

Berdasarkan hasil penelitian, kadar antioksidan untuk ekstrak metanol 50% suhu 45°C dan metanol 50% suhu 30°C adalah 17,3955 ppm dan 14,1615 ppm, secara berurutan. Sedangkan %*radical scavenging* untuk asam askorbat, ekstrak metanol 50% suhu 45°C, dan ekstrak metanol 50% suhu 30°C

adalah 70,37%, 68,22%, dan 61,22%, secara berurutan. %*radical scavenging* menandakan kemampuan antioksidan dalam menetralkan senyawa DPPH yang bersifat radikal. Pada penelitian ini terlihat bahwa %*radical scavenging* untuk kedua sampel mendekati %*radical scavenging* asam askorbat. Hal ini menandakan bahwa ekstrak daun nyamplung memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. Dengan demikian, hasil tersebut membuktikan bahwa ekstrak dengan kandungan fenolik dan flavonoid yang tinggi akan menghasilkan aktivitas antioksidan yang tinggi.

IV.6. Hubungan antara TPC, TFC, dan Aktivitas Antioksidan

Senyawa flavonoid merupakan bagian atau dari senyawa fenolik, sehingga dalam menganalisa kandungan polifenol, hasil TPC akan lebih besar daripada TFC. Akan tetapi, berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, hasil TFC lebih besar daripada hasil TPC. Hal tersebut dapat disebabkan karena reagen Folin-Ciocalteu yang digunakan dalam analisa TPC tidak hanya bereaksi dengan senyawa fenolik, namun mampu bereaksi terhadap senyawa non-fenolik lainnya (asam askorbat, senyawa amina aromatik, sulfur dioksida dan senyawa asam organik lainnya) sehingga kuantitas dari senyawa fenolik tidak dapat diperoleh secara maksimal (Lester *et al*, 2011). Menurut Katsube *et al*, 2004, satu metode TPC tidak cukup untuk mengukur semua senyawa fenolik karena struktur kimia senyawa fenolik yang sangat kompleks. Berbeda dengan analisa TPC, dimana terdapat berbagai macam faktor yang memberikan hasil kurang maksimal, analisa TFC lebih mudah mendeteksi senyawa flavonoid karena struktur kimia yang tidak terlalu kompleks.

Adapun metode yang dapat digunakan untuk memaksimalkan kuantitas dari analisa TPC adalah metode *Fast Blue BB*. Metode ini secara spesifik dapat bereaksi dengan senyawa fenolik di bawah kondisi basa dan memberikan jumlah

kandungan fenolik yang lebih baik dibandingkan dengan metode Folin-Ciocalteu (Medina, 2011). Selain itu, analisa TPC juga dapat menggunakan metode HPLC. Metode ini mampu menganalisa komponen senyawa fenolik bersamaan dengan senyawa derivatif maupun senyawa fenolik yang terdegradasi. Namun demikian, dari berbagai macam metode yang digunakan dalam analisa TPC pada tanaman, tidak ada metode yang sempurna yang mampu merepresentasikan total fenolik. Hal ini dikarenakan karakteristik dari senyawa fenolik yang begitu beragam dan kompleks, serta kemungkinan adanya intervensi dari berbagai senyawa non-fenolik pada tanaman (Jin dan Russell, 2010).

Adanya senyawa fenolik maupun flavonoid yang terdeteksi dari hasil uji total kandungan fenolik dan flavonoid pada penelitian ini membuktikan bahwa daun nyamplung memiliki sifat antioksidan. Senyawa fenolik merupakan antioksidan yang memiliki potensi lebih besar dibandingkan dengan Vitamin C, E maupun karotenoid. Sifat antioksidan dari senyawa fenolik dibuktikan dari perilaku antioksidan terhadap senyawa radikal DPPH (*1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl*) dalam menetralkan radikal bebas yang sesuai dengan metode analisa aktivitas antioksidan.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

V.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian dan hasil analisa, dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Jenis pelarut yang digunakan tidak mempengaruhi secara signifikan terhadap %*yield*, TPC, dan TFC (P-value>0,05).
2. Konsentrasi pelarut mempengaruhi TPC dan TFC secara signifikan (P-value<0,05), tetapi tidak terhadap %*yield* (P-value>0,05).
3. Temperatur ekstraksi mempengaruhi TPC secara signifikan (P-value<0,05), tetapi tidak terhadap %*yield* dan TFC (P-value>0,05).
4. Analisa *free radical scavenging* dengan DPPH menunjukkan daun nyamplung memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi.
5. Kondisi optimum yang menghasilkan %*yield* tertinggi adalah aseton 50% pada suhu 60°C (18,67%).
6. Kondisi optimum yang menghasilkan TPC tertinggi adalah methanol 50% pada suhu 45°C (292,044 mg GAE/gram ekstrak).
7. Kondisi optimum yang menghasilkan TFC tertinggi adalah methanol 50% pada suhu 30°C (1289 mg QE/gram ekstrak).

V.2 Saran

1. Melakukan penelitian dengan metode analisa TPC yang berbeda agar didapatkan hasil TPC yang maksimal.
2. Penelitian lanjutan dapat dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa fenolik dan flavonoid yang terkandung di daun nyamplung berdasarkan kondisi optimum yang didapat dari penelitian ini.

(Halaman ini sengaja dikosongkan)

APPENDIKS

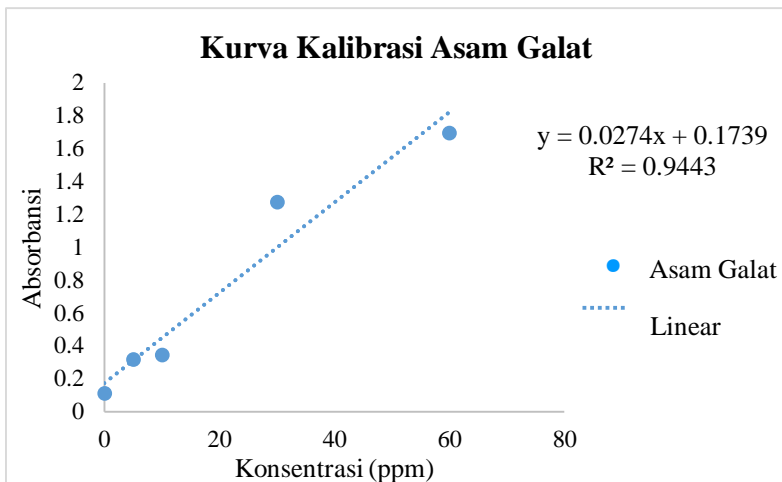
A.1 Kurva Kalibrasi

Kurva kalibrasi diperoleh dari pembacaan absorbansi pada larutan standar menggunakan *UV-VIS Spectrophotometer*.

A.1.1 Asam Galat

Tabel A.1.1 Kalibrasi Asam Galat

Konsentrasi Asam Galat (ppm)	Absorbansi
0	0.113
5	0.317
10	0.347
30	1.277
60	1.697

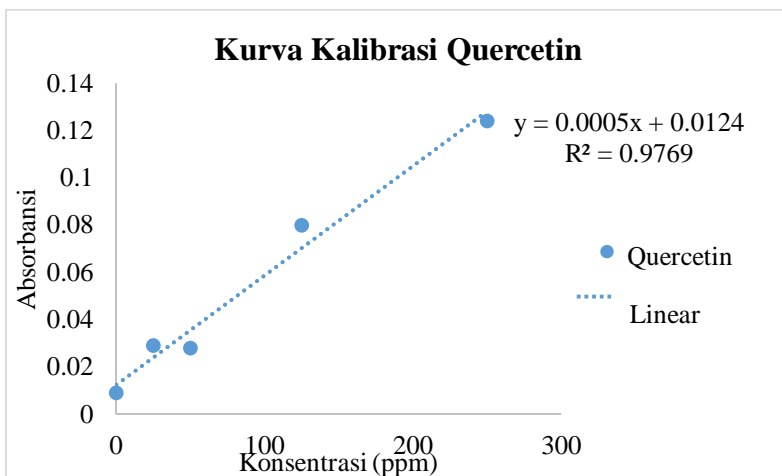


Gambar A.1.1 Kurva Kalibrasi Asam Galat

A.1.2 Quercetin

Tabel A.1.2 Kalibrasi Quercetin

Konsentrasi Asam Galat (ppm)	Absorbansi
0	0.009
25	0.029
50	0.028
125	0.08
250	0.124

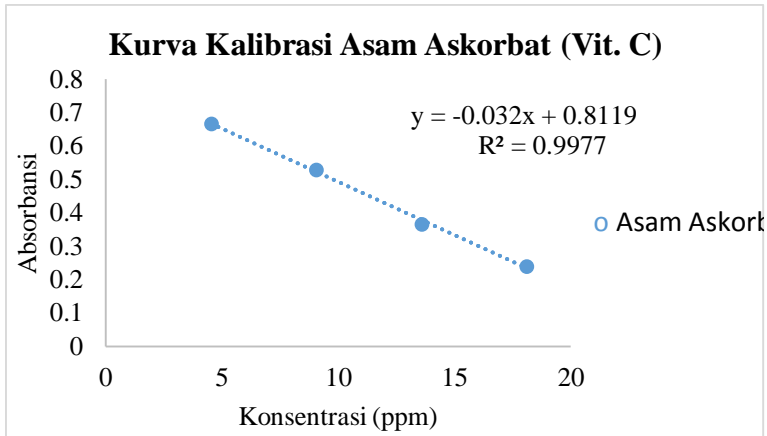


Gambar A.1.2 Kurva Kalibrasi Quercetin

A.1.3 Asam Askorbat (Vitamin C)

Tabel A.1.3 Kalibrasi Asam Askorbat

Konsentrasi Asam Askorbat (ppm)	Absorbansi
4.53	0.666
9.06	0.529
13.58	0.365
18.11	0.239



Gambar A.1.3 Kurva Kalibrasi Asam Askorbat

A.2 Perhitungan Analisa *Total Phenolic Content* (TPC)

Berdasarkan kurva kalibrasi asam galat, diperoleh persamaan $y = 0.0274x + 0.1739$, dimana y merupakan absorbansi sampel dan x merupakan konsentrasi sampel dalam satuan ppm. Contoh perhitungan diambil pada variabel etanol 100% suhu 30°C pada run 1 dimana absorbansi yang terbaca sebesar 0.226.

$$A = y = 0.226$$

$$0.226 = 0.0274x + 0.1739$$

*dimana x merupakan konsentrasi TPC (mg GAE/L)

$$x = \frac{0.226 - 0.1739}{0.0274}$$

$$x = 1.901 \text{ mg GAE/L}$$

$$\text{Kadar TPC} = \frac{C \times V}{M}$$

Dimana,

Kadar TPC = (mg GAE/g *crude extract*)

C = konsentrasi hasil perhitungan kalibrasi (mg/L)

V = volume larutan ekstrak (L)

M = massa ekstrak yang digunakan dalam analisa (g)

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar TPC} &= 1.901 \frac{\text{mg GAE}}{\text{L}} \times \frac{0.1 \text{ L}}{0.005 \text{ g crude extract}} \\
 &= 38.029 \frac{\text{mg GAE}}{\text{g crude extract}}
 \end{aligned}$$

A.3 Perhitungan Analisa *Total Flavonoid Content* (TFC)

Berdasarkan kurva kalibrasi quercetin, diperoleh persamaan $y = 0.0005x + 0.0124$, dimana y merupakan absorbansi sampel dan x merupakan konsentrasi sampel dalam satuan ppm. Contoh perhitungan diambil pada variabel etanol 100% suhu 30°C pada run 1 dimana absorbansi yang terbaca sebesar 0.234.

$$A = y = 0.234$$

$$0.234 = 0.0005x + 0.0124$$

*dimana x merupakan konsentrasi TFC (mg QE/L)

$$x = \frac{0.234 - 0.0124}{0.0005}$$

$$x = 1479.6 \text{ mg QE/L}$$

$$\text{Kadar TFC} = \frac{C \times V}{M}$$

Dimana,

Kadar TFC = (mg QE/g *crude extract*)

C = konsentrasi hasil perhitungan kalibrasi (mg/L)

V = volume larutan ekstrak (L)

M = massa ekstrak yang digunakan dalam analisa (g)

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar TFC} &= 479.6 \frac{\text{mg QE}}{\text{L}} \times \frac{1 \text{ L}}{1 \text{ g crude extract}} \\
 &= 479.6 \frac{\text{mg QE}}{\text{g crude extract}}
 \end{aligned}$$

Tabel A.1 Hasil Perhitungan *Total Phenolic Content* (TPC)

Jenis Solvent	Konsentrasi (%)	Suhu (°C)	TPC (mg GAE/g extract)
Aseton	50	30	286.934
	80		144.599
	100		65.766
	50	45	279.635
	80		146.058
	100		NOT AVAILABLE
	50	60	143.139
	80		NOT DETECTED
	100		NOT AVAILABLE
Metanol	50	30	67.226
	80		289.124
	100		143.139
	50	45	292.044
	80		146.788
	100		NOT AVAILABLE
	50	60	153.358
	80		NOT AVAILABLE
	100		NOT DETECTED
Etanol	50	30	267.956
	80		111.752
	100		38.029
	50	45	72.336
	80		115.401
	100		159.197
	50	60	124.161

	80		1.533
	100		NOT AVAILABLE

Tabel A.2 Hasil Perhitungan *Total Flavonoid Content* (TFC)

Jenis Solvent	Konsentrasi (%)	Suhu (°C)	TFC (mg QE/g extract)
Aseton	50	30	994.8
	80		497
	100		585.7
	50	45	923.4
	80		566.2
	100		328.1
	50	60	494.8
	80		NOT DETECTED
	100		481.8
Metanol	50	30	1289
	80		410.4
	100		574.9
	50	45	810
	80		522.9
	100		568.4
	50	60	1038
	80		594.4
	100		NOT DETECTED

Etanol	50	30	572.7
	80		481.8
	100		479.6
	50	45	754.6
	80		899.6
	100		440.7
	50	60	1051
	80		583.5
	100		644.2

A.4 Perhitungan Analisa Aktivitas Antioksidan

Berdasarkan kurva kalibrasi asam askorbat diperoleh persamaan $y = -0.032x + 0.8119$, dimana y merupakan absorbansi sampel dan x merupakan konsentrasi sampel dalam satuan ppm. Contoh perhitungan untuk mengetahui kadar antioksidan diambil pada sampel metanol dengan konsentrasi 50%, suhu 30°C dimana absorbansi diperoleh 0.359.

$$A = y = 0.359$$

$$0.359 = -0.032x + 0.8119$$

*dimana x merupakan konsentrasi TFC (mg QE/L)

$$x = \frac{0.359 - 0.8119}{-0.032}$$

$$x = 14.1615 \text{ mg As. Askorbat/L}$$

Untuk perhitungan aktivitas antioksidan direpresentasikan dari %radical scevanging.

$$\% \text{ Rad. Scavenging} = \frac{\text{Absorbansi Kontrol} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Kontrol}} \times 100\%$$

Dimana,

Absorbansi Kontrol = Tanpa ada penambahan asam askorbat (hanya metanol dan DPPH)

Absorbansi Sampel = Absorbansi Ekstrak

$$\% \text{ Rad. Scavenging} = \frac{0.807 - 0.539}{0.807} \times 100\%$$
$$\% \text{ Rad. Scavenging} = 68.22\%$$

Tabel A.2 Hasil Perhitungan Analisa Aktivitas Antioksidan

Sampel	Kadar Antioksidan	% Radical Scavenging
Asam Askorbat	18.11	70.37%
Metanol 50% (30°C)	14.1615	61.22%
Metanol 50% (45°C)	17.395	68.22%

RIWAYAT PENULIS I



Penulis bernama Imelia Yohed dilahirkan di Kota Tangerang pada tanggal 18 Mei 1995. Merupakan anak ke 3 dari 3 bersaudara. Penulis telah menempuh pendidikan yaitu: SD Slamet Riyadi I Tangerang, SMP Negeri 9 Tangerang, dan SMA Negeri 2 Tangerang. Setelah lulus SMA, penulis melanjutkan pendidikan ke jenjang Strata 1 (S1) jurusan Teknik Kimia FTI-ITS. Pada akhir masa studi, penulis mengerjakan Tugas Pra Desain Pabrik Minyak Goreng dari Dedak Padi. Penulis melakukan Tugas Akhir di Laboratorium Teknologi Biokimia di bawah bimbingan Bapak Setiyo Gunawan, S.T., Ph.D. Dengan penulisan skripsi ini, penulis berharap agar buku skripsi ini bermanfaat bagi kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi. Untuk menghubungi penulis dapat melalui email berikut yoheed18@gmail.com

RIWAYAT PENULIS II



Penulis bernama Rachel Angie Kristianita, dilahirkan di Kota Gresik pada tanggal 20 Juni 1995, merupakan anak ke-1 dari 2 bersaudara. Penulis telah menempuh pendidikan: SD Negeri Petrokimia Gresik, SMP Negeri 1 Gresik, dan SMA Negeri 1 Gresik. Setelah lulus SMA, penulis melanjutkan Pendidikan ke jenjang Strata 1 (S1) Jurusan Teknik Kimia FTI-ITS. Pada masa akhir studi, penulis mengerjakan Tugas Pra Desain Pabrik Minyak Goreng dari Dedak Padi. Penulis melakukan Tugas Akhir di Laboratorium Teknologi Biokimia di bawah bimbingan Bapak Setiyo Gunawa, S.T., Ph.D. Dengan penulisan skripsi ini, penulis berharap agar buku skripsi ini bermanfaat bagi kemajuan pengetahuan dan teknologi. Untuk menghubungi penulis dapat melalui email berikut: rangiekrist@gmail.com.